

Novas Estratégias de Combate à Resistência Bacteriana

Bárbara Joana Magalhães Abreu

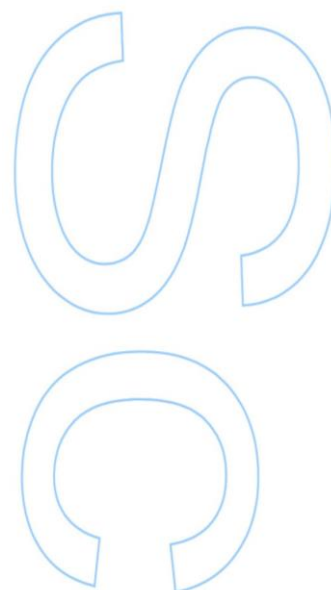
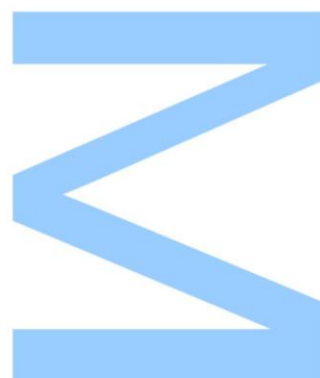
Mestrado em Química
Departamento de Química e Bioquímica
2016

Orientador

Paula Gameiro, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto

Coorientador

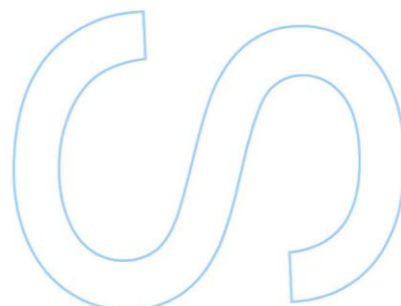
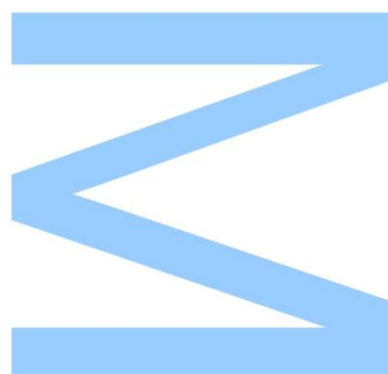
Peter Eaton, Investigador, Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto





Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Para o meu pai e avós,

Agradecimentos

À professora Paula Gameiro por todo o apoio, ajuda, compreensão, paciência e por todas as oportunidades que me proporcionou ao longo destes dois anos.

À Mariana pela amizade, fora e dentro do laboratório, pela boa disposição, por todos os conselhos e pela orientação.

À Carla pela amizade e por toda a ajuda que sempre demonstrou.

À Rita pela amizade, carinho e apoio, ao longo destes cinco anos.

À Catarina, ao Daniel, ao Carlos e a todos da “mesa do canto” do bar de Química por todo o apoio, conselhos e comentários úteis durante esta fase final.

E, por último, à mãe por todo o apoio, paciência, incentivo, força, pela ajuda em todos os momentos difíceis, por todas as palavras de conforto e por nunca ter desistido de mim. Obrigada por tudo!

Resumo

As quinolonas são fármacos sintéticos que pertencem a um grupo de agentes antibacterianos, usadas no tratamento de várias infeções bacterianas devido ao seu espectro de atividade. O mecanismo de ação das quinolonas consiste na inibição das enzimas responsáveis pela replicação do DNA – a topoisomerase II e a topoisomerase IV. Devido ao espectro limitado das quinolonas da 1ª geração, como o ácido nalidíxico, foram efetuadas alterações na estrutura básica das quinolonas de forma a aumentar a sua atividade antibacteriana, nomeadamente a introdução de um átomo de flúor na posição 6 do núcleo 4-quinolona, dando origem às fluoroquinolonas.

O principal problema do uso excessivo e indevido de fluoroquinolonas é o aumento da resistência bacteriana, o que compromete a eficácia destes fármacos como agentes antimicrobianos.

A resistência microbiana aos antibióticos originou a conceção de fármacos novos e modificados. Como tal, o conceito de complexação entre metais e fluoroquinolonas ganhou interesse como uma estratégia para aumentar a atividade biológica das fluoroquinolonas, reduzir os efeitos adversos e neutralizar a resistência bacteriana, dando origem aos metaloantibióticos. Estes novos compostos podem apresentar-se sob a forma de complexos binários (metal/fluoroquinolona) ou de complexos ternários (metal/fluoroquinolona/1,10-fenantrolina).

Neste trabalho foram estudados os complexos binário e ternário entre o catião de metal ferro(III) e a fluoroquinolona Moxifloxacina. Inicialmente foram determinadas as constantes de estabilidade destes complexos, através da técnica de espectroscopia de ultravioleta-visível, de forma a avaliar o comportamento dos complexos em solução. Após a determinação das constantes de formação verificou-se que o complexo ternário Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina é o metaloantibiótico mais estável em solução e, como tal, foi utilizado em estudos seguintes.

Para se compreender o mecanismo de ação do complexo ternário foram realizados estudos da sua interação e localização com sistemas miméticos de membranas biológicas, tais como o extrato total de *Escherichia coli* e o sistema sintético dimiristoílfosfatidilcolina (DMPC). Nestes estudos foram utilizadas técnicas de fluorescência em modo estacionário e de fluorescência resolvida no tempo.

Estes estudos permitiram concluir que o complexo ternário Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina poderá ser um potencial antibiótico no combate à resistência bacteriana, visto que a sua interação é maior com o sistema membranal

mimético das bactérias Gram-negativas localizando-se na camada mais interna da bicamada fosfolipídica.

Palavras-chave: Fluoroquinolonas, Metaloantibióticos, Lipossomas, Membranas Bacterianas, Constantes de Estabilidade, Fluorescência em Modo Estacionário, Fluorescência Resolvida no Tempo.

Abstract

Quinolones are synthetic drugs belonging to a group of antibacterial agents, used in the treatment of various bacterial infections due to their spectrum of activity. The quinolone mechanism of action is inhibition of the enzymes responsible for DNA replication - topoisomerase II and topoisomerase IV. Due to the limited spectrum of first generation quinolones, such as nalidixic acid, changes were made to the basic structure of the quinolones to increase its antibacterial activity, namely the introduction of a fluorine atom at the 6-position of the 4-quinolone nucleus, giving rise to fluoroquinolones.

The main problem of excessive and improper use of fluoroquinolones is increasing bacterial resistance, which compromises the effectiveness of these drugs as antimicrobial agents.

Microbial resistance to antibiotics led to the design of new drugs and modified. As such, the concept of complexation of metals and fluoroquinolones has gained interest as a strategy to increase the biological activity of fluoroquinolones, reduce adverse effects and neutralize bacterial resistance, giving rise to metalloantibiotics. These new compounds may be present in the form of binary complexes (metal / fluoroquinolone) or ternary complexes (metal / fluoroquinolone / 1,10-phenanthroline).

In this work the binary and ternary complexes were studied between iron (III) metal cation and the fluoroquinolone moxifloxacin. Initially, we determined the stability constants of such complexes by ultraviolet-visible spectroscopy technique, in order to evaluate the behavior of the complexes in solution. After determining the formation constants found that the ternary complex Fe (III) / Moxifloxacin / 1,10-Phenanthroline metalloantibiotic is the most stable in solution and, as such, was used in these studies.

To understand the ternary complex mechanism of action studies have been conducted of their interaction and location with mimetic systems of biological membranes, such as the total extract of *Escherichia coli* and dimyristoylphosphatidylcholine synthetic system (DMPC). In these studies, we used steady-state and time resolved fluorescence techniques.

These studies showed that the ternary complex Fe (III) / Moxifloxacin / 1,10-Phenanthroline could be a potential antibiotic to combat bacterial resistance, since their interaction is enhanced with the membrane mimetic system of Gram-negative bacteria finding my in the innermost layer of the phospholipid bilayer.

Keywords: Fluoroquinolones, Metalloantibiotics, Liposomes, Bacterial Membranes, Stability Constants, Steady-State Fluorescence, Time-Resolved Fluorescence.

Índice

Agradecimentos	V
Resumo	vi
Abstract	viii
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xvi
Abreviaturas	xvii
CAPÍTULO I: Introdução	1
1. Quinolonas	2
1.1. Classificação das quinolonas.....	2
2. Fluoroquinolonas	4
2.1. Moxifloxacina.....	5
3. Mecanismo de Ação das Fluoroquinolonas	7
4. Mecanismo de Resistência Bacteriana	8
5. Complexação de Fluoroquinolonas com Cátions de Metais	9
6. Membranas Biológicas	11
6.1. Lipossomas.....	12
6.1.1. Características dos Lipossomas.....	13
7. Métodos Experimentais	15
7.1. Constantes de Estabilidade.....	15
7.2. Estudos de interação membranas.....	16
7.2.1. Determinação de coeficientes de partição membranas.....	16
7.3. Estudos de localização membranas.....	17
7.3.1. Fluorescência.....	17
7.3.2. Extinção de Fluorescência.....	18
7.3.3. Fluorescência em Modo Estacionário.....	20
7.3.4. Fluorescência Resolvida no Tempo.....	21
7.3.5. Sondas de Fluorescência.....	22
7.3.6. Efeito de Filtro Interno.....	23
CAPÍTULO II: Materiais e Métodos	25
1. Reagentes	26
2. Instrumentação	26
3. Determinação Espectrofotométrica de Constantes de Estabilidade	27
4. Preparação da solução tampão Hepes	28
5. Preparação da solução de complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina	28

6. Preparação de lipossomas.....	28
7. Preparação e doseamento da solução de iodeto de potássio.....	29
8. Estudos de interação membranas.....	29
9. Estudos de localização membranas.....	30
9.1. Utilização da fluorescência em modo estacionário.....	30
9.2. Utilização da fluorescência resolvida no tempo.....	30
9.2.1. Utilização de sondas de fluorescência.....	31
CAPÍTULO III: Resultados e Discussão.....	32
1. Determinação das constantes de estabilidade.....	33
1.1. Sistema binário Fe(III)/Moxifloxacina, nas razões 1:1 e 1:2.....	33
1.2. Sistema ternário Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina, na razão 1:1:1.....	35
1.3. Diagramas de distribuição de espécies.....	38
1.4. Discussão de resultados.....	40
2. Determinação da lei de Lambert-Beer do complexo ternário Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina.....	42
3. Diâmetro e Polidispersão de Lipossomas.....	43
4. Estudos de interação membranas.....	44
4.1. Determinação do coeficiente de partição do complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina em lipossomas de extrato total de <i>E.coli</i>	44
4.2. Determinação do coeficiente de partição do complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina no sistema DMPC.....	46
4.3. Discussão de resultados.....	48
5. Estudos de localização membranas.....	49
5.1. Utilização do iodeto de potássio como agente de extinção de fluorescência.....	49
5.1.1. Determinação das constantes de Stern-Volmer por fluorescência em modo estacionário.....	49
5.1.2. Determinação das constantes de Stern-Volmer por fluorescência resolvida no tempo.....	51
5.1.3. Discussão de resultados.....	52
5.2. Utilização de sondas de fluorescência incorporadas nos sistemas lipídicos.....	53
5.2.1. Determinação das constantes de Stern-Volmer por fluorescência resolvida no tempo.....	53
5.2.2. Discussão de resultados.....	56
CAPÍTULO IV: Considerações Finais.....	58

CAPÍTULO V: Bibliografia.....	61
--------------------------------------	-----------

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura comum do grupo 4-quinolona.....	2
Figura 2 – Estrutura química da Moxifloxacina, sob a forma hidrocloreada.....	5
Figura 3 – Equilíbrio de protonação da Moxifloxacina.....	6
Figura 4 – Mecanismo de Ação das Fluoroquinolonas.....	7
Figura 5 – Mecanismo de Resistência Bacteriana por: 1 – Mutações dos canais de permeabilidade ou 2 – Mutações das topoisomerases.....	8
Figura 6 – Modos de coordenação dos metais às fluoroquinolonas a) para os complexos binários e b) para os complexos ternários.....	9
Figura 7 – Estrutura típica da membrana de bactérias a) Gram-positivas e b) Gram-negativas.....	11
Figura 8 – Estrutura dos lipossomas.....	13
Figura 9 – Representação esquemática dos diferentes tipos de lipossomas.....	14
Figura 10 – Representação esquemática do método de hidratação do filme lipídico....	14
Figura 11 – Representação esquemática da transição de fases dos fosfolípidos.....	15
Figura 12 – Diagrama de Jablonski.....	18
Figura 13 – Estrutura das sondas de fluorescência: a) DPH e b) TMA-DPH.....	22
Figura 14 – Espectros de absorção da Moxifloxacina $2,5 \times 10^{-5}M$ a diferentes pH.....	33
Figura 15 – Espectros de absorção do sistema binário Fe(III)/Moxifloxacina $2,5 \times 10^{-5}M$, na razão 1:1, a diferentes pH.....	34
Figura 16 – Espectros de absorção do sistema binário Fe(III)/Moxifloxacina $1,25 \times 10^{-5}M$ – $2,5 \times 10^{-5}M$, na razão 1:2, a diferentes pH.....	34
Figura 17 – Espectros de absorção da 1,10-Fenantrolina $2,5 \times 10^{-5}M$, a diferentes pH.....	36
Figura 18 – Espectros de absorção do complexo Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina $2,5 \times 10^{-5}M$, na razão 1:1, a diferentes pH.....	36
Figura 19 – Espectros de absorção do complexo Ferro(III)/1,10-Fenantrolina $2,5 \times 10^{-5}M$, na razão 1:1, a diferentes pH.....	37
Figura 20 – Espectros de absorção do sistema ternário Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina $2,5 \times 10^{-5}M$, na razão 1:1:1, a diferentes pH.....	37
Figura 21 – Diagrama de distribuição de espécies para o complexo Fe(III)/Moxifloxacina, na razão 1:1 ($[Fe(III)] = 2,5 \times 10^{-5}M$ e $[Moxifloxacina] = 2,5 \times 10^{-5}M$).....	38

Figura 22 – Diagrama de distribuição de espécies para o complexo Fe(III)/Moxifloxacina, na razão 1:2 ($[Fe(III)] = 1,25 \times 10^{-5} M$ e $[Moxifloxacina] = 2,5 \times 10^{-5} M$).....	39
Figura 23 – Diagrama de distribuição de espécies para o complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina ($[Fe(III)] = 2,5 \times 10^{-5} M$, $[Moxifloxacina] = 2,5 \times 10^{-5} M$ e $[1,10-Fenantrolina] = 2,5 \times 10^{-5} M$).....	39
Figura 24 – Espectros de absorção de soluções com concentrações crescentes (M) de complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina: (A0) 2×10^{-5} ; (A1) $1,5 \times 10^{-5}$; (A2) 1×10^{-5} ; (A3) 6×10^{-6} ; (A4) 3×10^{-6} ; (A5) 1×10^{-6}	42
Figura 25 - Espectro de emissão de fluorescência do complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina na ausência (A0) e na presença (A1 a A9) de concentrações crescentes (μM) do sistema lipídico extrato total de <i>E.coli</i> : (A1) 119; (A2) 236; (A3) 352; (A4) 465; (A5) 577; (A6) 687; (A7) 795; (A8) 902; (A9) 1008.....	44
Figura 26 - Representação gráfica $\Delta I = f([E.coli \ T])$ para obtenção do coeficiente de partição.....	45
Figura 27 - Espectro de emissão de fluorescência do complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina na ausência (A0) e na presença (A1 a A9) de concentrações crescentes (μM) do sistema lipídico DMPC: (A1) 119; (A2) 236; (A3) 352; (A4) 465; (A5) 577; (A6) 687; (A7) 795; (A8) 902; (A9) 1008.....	46
Figura 28 - Representação gráfica $\Delta I = f([DMPC])$ para obtenção do coeficiente de partição.....	47
Figura 29 – Espectro de emissão de fluorescência do complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina, na ausência de lípido (A0) e na presença (A1 a A10) de concentrações crescentes (μM) de KI: (A1) 50; (A2) 100; (A3) 150; (A4) 200; (A5) 250; (A6) 300; (A7) 350; (A8) 400; (A9) 450; (A10) 500.....	49
Figura 30 – Espectros de emissão de fluorescência do complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina, na presença de <i>E.coli</i> T - a) 250 μM ; b) 500 μM e c) 750 μM - e na presença (A1 a A10) de concentrações crescentes (μM) de KI: (A1) 50; (A2) 100; (A3) 150; (A4) 200; (A5) 250; (A6) 300; (A7) 350; (A8) 400; (A9) 450; (A10) 500.....	50
Figura 31 – Espectros de emissão de fluorescência do complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina, na presença de DMPC - a) 250 μM ; b) 500 μM e c) 750 μM - e na presença (A1 a A10) de concentrações crescentes (μM) de KI: (A1) 50; (A2) 100; (A3) 150; (A4) 200; (A5) 250; (A6) 300; (A7) 350; (A8) 400; (A9) 450; (A10) 500.....	50
Figura 32 – Representação gráfica $I F_0 / I F = f([KI])$ para obtenção das constantes de Stern-Volmer (a) do complexo ternário; (b) do complexo ternário, na presença de	

concentrações crescentes de extrato total de *E.coli* e (c) do complexo ternário, na presença de concentrações crescentes de DMPC, através da fluorescência em modo estacionário.....50

Figura 33 - Representação gráfica $\tau_0/\tau = f(|KI|)$ para obtenção das constantes de Stern-Volmer (a) do complexo ternário; (b) do complexo ternário, na presença de concentrações crescentes de extrato total de *E.coli* e (c) do complexo ternário, na presença de concentrações crescentes de DMPC, através da fluorescência resolvida no tempo.....51

Figura 34 - Representação gráfica $\tau_0/\tau = f(|\text{Fármaco}|_{\text{membranar}})$ para obtenção das constantes de Stern-Volmer (a) da sonda DPH incorporada no sistema extrato total de *E.coli* com adição de concentrações crescentes de metaloantibiótico (a1) e de fluoroquinolona livre (a2) e (b) da sonda TMA-DPH incorporada no sistema extrato total de *E.coli* com adição de concentrações crescentes de metaloantibiótico (b1) e de fluoroquinolona livre (b2).....53

Figura 35 - Representação gráfica $\tau_0/\tau = f(|\text{Fármaco}|_{\text{membranar}})$ para obtenção das constantes de Stern-Volmer (a) da sonda DPH incorporada no sistema DMPC com adição de concentrações crescentes de metaloantibiótico (a1) e de fluoroquinolona livre (a2) e (b) da sonda TMA-DPH incorporada no sistema DMPC com adição de concentrações crescentes de metaloantibiótico (b1) e de fluoroquinolona livre (b2).....54

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Classificação das Quinolonas.....	3
Tabela 2 – Relação Estrutura-Atividade das Quinolonas.....	4
Tabela 3 – Constantes de equilíbrio da Moxifloxacina.....	6
Tabela 4 – Constantes de protonação da Moxifloxacina.....	34
Tabela 5 – Constantes de estabilidade determinadas com o programa HypSpec 2014 para o sistema binário Fe(III)/Moxifloxacina (nas razões 1:1 e 1:2).....	35
Tabela 6 – Constante de acidez da 1,10-Fenantrolina e constantes de estabilidade dos complexos Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina e Fe(III)/1,10-Fenantrolina.....	35
Tabela 7 – Constantes de estabilidade determinadas com o programa HypSpec 2014 para o sistema ternário Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina, na razão 1:1:1.....	38
Tabela 8 – Constantes de estabilidade para o sistema binário Cu(II)/Moxifloxacina.....	40
Tabela 9 – Constantes de estabilidade para os sistemas ternários Cu(II)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina.....	40
Tabela 10 – Gama de concentrações do complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina usadas nos estudos de interação e localização membranar.....	43
Tabela 11 – Valor do coeficiente de partição e respetivo desvio-padrão.....	45
Tabela 12 – Valor do coeficiente de partição e respetivo desvio-padrão.....	47
Tabela 13 – Coeficientes de partição da Moxifloxacina livre e do complexo Cu(II)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina, nos sistemas lipídicos DMPC e extrato total de <i>E.coli</i>	48
Tabela 14 – Valor das constantes de Stern-Volmer, obtidos por fluorescência em modo estacionário.....	51
Tabela 15 - Valor das constantes de Stern-Volmer, obtidos por fluorescência resolvida no tempo.....	51
Tabela 16 - Valor das constantes de Stern-Volmer para o complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina, obtidos por fluorescência resolvida no tempo, utilizando sondas de fluorescência.....	54
Tabela 17 - Valor das constantes de Stern-Volmer para a Moxifloxacina, obtidos por fluorescência resolvida no tempo, utilizando sondas de fluorescência.....	55

Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico
DPH – 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
TMA-DPH - trimetilamónio-difenil-hexatrieno
E. coli T – Extrato total de *Escherichia coli*
Hepes - Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N-etanossulfónico
LUV's – Large Unilamellar Vesicles
SUV's – Small Unilamellar Vesicles
MLV's – Multilamellar Vesicles
Mxflx – Moxifloxacina
Phen – 1,10-Fenantrolina
FQ – Fluoroquinolona
PE – Fosfatidiletanolamina
PG – Fosfatidilglicerol
 T^m – Temperatura de Transição
 K_p – Coeficiente de Partição
 K_{SV} – Constante de Stern-Volmer

CAPÍTULO I: Introdução

1. Quinolonas

As quinolonas são moléculas sintéticas que pertencem ao grupo dos agentes antibacterianos, usadas no tratamento de infecções bacterianas. Estas moléculas apresentam um núcleo comum, o grupo 4-quinolona, responsável pela ação antibacteriana destes fármacos que possui um azoto na posição 1, um grupo carboxílico na posição 3 e uma cetona na posição 4. [1, 2]

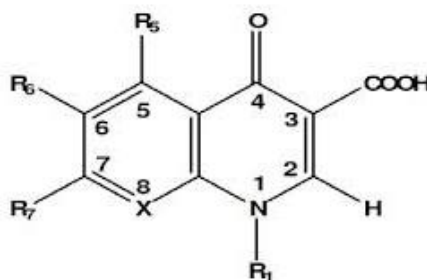


Figura 1 – Estrutura comum do grupo 4-quinolona.

As quinolonas apresentam três características farmacocinéticas únicas: podem penetrar tecidos infetados, exercem um efeito pós-antibiótico (ou seja, a sua atividade antibacteriana persiste, apesar da sua concentração no sangue ser baixa) e a morte das células bacterianas está diretamente dependente da concentração de fármaco (isto é, quanto maior a dose de fármaco, maior o número de células bacterianas mortas). [1]

1.1. Classificação das quinolonas

A primeira quinolona a ser desenvolvida foi o ácido nalidíxico, que se caracterizava por possuir uma atividade limitada contra organismos Gram-negativos, tendo sido principalmente utilizado no tratamento de infeções urinárias. Devido ao seu espectro de atividade limitado foram introduzidas modificações estruturais para ampliar a atividade biológica das quinolonas e diminuir a sua toxicidade. [2, 3]

Estas modificações estruturais conduziram ao aparecimento de várias quinolonas, agrupadas em quatro gerações, de acordo com o seu espectro de ação (Tabela 1). [2, 4]

Tabela 1 – Classificação das Quinolonas.

Classificação	Exemplos	Espetro de Atividade
1ª Geração	Ácido Nalidíxico Cinoxacina Ácido Pipemídico	Atividade moderada contra organismos Gram-negativos; Tratamento de infeções do trato urinário.
2ª Geração	Ciprofloxacina Norfloxacina Ofloxacina Lomefloxacina Enoxacina	Excelente atividade contra organismos Gram-negativos; Atividade limitada contra organismos Gram-positivos; Tratamento de infeções do trato urinário, respiratório, gastrointestinal e da pele.
3ª Geração	Levofloxacina Sparfloxacina Grepafloxacina	Espetro de atividade igual ao da geração anterior, mas mais alargado para espécies Gram-positivas e espécies anaeróbias; Tratamento de infeções do trato respiratório.
4ª Geração	Trovafloxacina Gatifloxacina Moxifloxacina	Excelente atividade contra organismos Gram-negativos, Gram-positivas, espécies anaeróbias e estirpes resistentes; Tratamento de infeções idêntico ao da geração anterior.

Na tabela 2 são apresentadas as possíveis substituições no núcleo 4-quinolona e como estas substituições se relacionam com a atividade antibacteriana das quinolonas. [5, 6, 7] Uma melhor compreensão da relação entre a estrutura e a atividade tem permitido modificar o núcleo básico das quinolonas de forma a aumentar ou limitar a atividade antimicrobiana e a melhorar certas propriedades como os tratamentos clínicos, a farmacocinética, interações com outros fármacos e a toxicidade das quinolonas. [8]

Tabela 2 – Relação Estrutura-Atividade das Quinolonas.

Posição	Relação Estrutura-Atividade
1	Substituintes mais utilizados: <i>etilo</i> , <i>ciclopropilo</i> e <i>2,4-difluorofenil</i> . Grupo <i>ciclopropilo</i> é responsável pelo aumento da atividade contra bactérias Gram-negativas.
2	Substituições no núcleo 4-quinolona diminuem a atividade microbiana.
3 e 4	Essenciais para a atividade antimicrobiana das quinolonas.
5	A introdução dos grupos <i>amino</i> , <i>hidroxilo</i> ou <i>metilo</i> aumenta a atividade <i>in vitro</i> contra bactérias Gram-positivas.
6	Substituintes mais utilizados: <i>H</i> , <i>Cl</i> , <i>Br</i> , <i>F</i> , <i>CH₃</i> , <i>SCH₃</i> , <i>COCH₃</i> , <i>CN</i> , <i>NO₂</i> . Átomo de flúor é o principal substituinte pois aumenta a inibição das enzimas topoisomerase, II e IV, e a entrada dos fármacos nas células bacterianas.
7	Grupo <i>piperazinilo</i> aumenta a atividade das quinolonas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.
8	A introdução de <i>halogéneos</i> aumenta o espectro de atividade, especialmente contra espécies anaeróbicas.

2. Fluoroquinolonas

As quinolonas de segunda geração destacam-se pela introdução de um átomo de flúor na posição 6 do núcleo 4-quinolona, levando ao aparecimento das fluoroquinolonas. [2]

As fluoroquinolonas representam uma classe de agentes antibacterianos de largo espectro, utilizadas em diversas infeções, como as do trato urinário, respiratório ou da pele, causadas por organismos Gram-negativos, Gram-positivos e espécies anaeróbicas. Estes compostos são caracterizados pelo seu baixo peso molecular (300-500 Da), pelo seu bom perfil farmacocinético, a sua disponibilidade em formulações orais ou intravenosas, a sua facilidade de administração oral e efeitos adversos reduzidos. [1, 2, 3, 9, 10]

Em geral, as fluoroquinolonas são pouco solúveis em água, apresentando apenas solubilidade em pH ácido ou pH básico. Dependendo do pH do sistema, os grupos amina (pK_a compreendido entre 7,6 e 9,3) e carboxílico (pK_a compreendido entre 5,5 e 6,3) podem estar, ou não, protonados. A pH ácido, os dois grupos estão protonados e a fluoroquinolona encontra-se na forma catiónica, enquanto que, a pH básico, os dois grupos estão desprotonados e a quinolona encontra-se na forma aniónica. Quando um

sistema apresenta pH idêntico ao pH fisiológico, só o grupo amina se encontra protonado e o grupo carboxílico encontra-se na forma de anião carboxilato. Assim, a fluoroquinolona apresenta-se na forma de ião dipolar. [11]

2.1. Moxifloxacina

A Moxifloxacina é uma fluoroquinolona de quarta geração que apresenta um grupo metoxi na posição 8, um anel diazabicyclononilo na posição 7 e um grupo ciclopropilo na posição 1. Estes grupos conferem uma elevada atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e espécies anaeróbicas e reduzem o efluxo das células bacterianas. [2]

Muitos antibióticos, como é o caso da Moxifloxacina, são usados sob a forma hidrociorada, de forma a facilitar a sua solubilidade em sistemas aquosos, devido à presença de cargas em solução. [30]

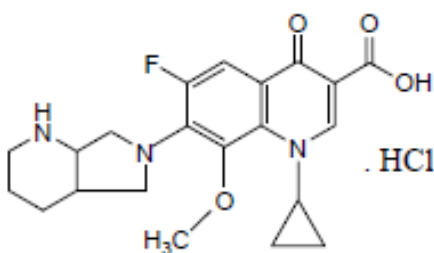


Figura 2 – Estrutura química da Moxifloxacina, sob a forma hidrociorada.

Tal como todas as fluoroquinolonas, a Moxifloxacina é uma molécula anfotérica, apresentando características ácidas ou básicas, dependendo do pH do meio, sendo que a pH fisiológico (7,4), a Moxifloxacina apresenta-se sob a forma de ião dipolar (92,9%) e na forma neutra (0,8%). [35]

Para avaliar a atividade antibacteriana das fluoroquinolonas é necessário ter em conta o pH do meio em que estas se encontram, visto que estes fármacos atuam por inibição de enzimas bacterianas, responsáveis pela replicação do ADN, através do grupo ácido na posição 3. Desta forma, para compreender a relação entre a estrutura e a atividade das fluoroquinolonas é necessário conhecer as suas propriedades físico-químicas, como as constantes de ionização e o respetivo equilíbrio de protonação. [12]

Por ser uma molécula anfotérica, a Moxifloxacina pode existir, em solução aquosa, sob a forma de quatro microespécies: espécie positiva (H_2Q^+), espécie ião dipolar (HQ^\pm), espécie neutra (HQ^0) e espécie negativa (Q^-). O esquema do equilíbrio de protonação entre estas quatro microespécies é apresentado na figura 3. [12]

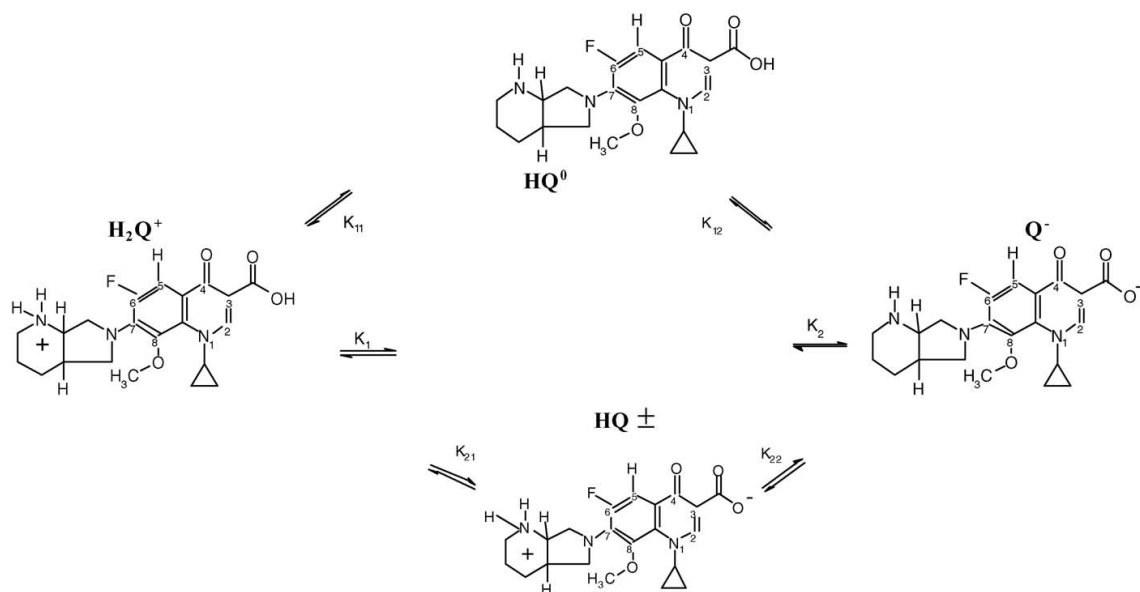


Figura 3 – Equilíbrio de protonação da Moxifloxacina.

O equilíbrio entre as quatro microespécies é caracterizado por constantes de ionização macroscópicas (K_1 e K_2) e microscópicas (k_{11} , k_{12} , k_{21} e k_{22}), descritas pelas seguintes expressões:

$$K_1 = \frac{[HQ^\pm] + [HQ^0]}{[H_2Q^+]} [H^+] \quad (1)$$

$$K_2 = \frac{[Q^-] [H^+]}{[HQ^\pm] + [HQ^0]} \quad (2)$$

$$k_{11} = \frac{[HQ^0] [H^+]}{[H_2Q^+]} \quad (3)$$

$$k_{12} = \frac{[Q^-] [H^+]}{[HQ^0]} \quad (4)$$

$$k_{21} = \frac{[HQ^\pm] [H^+]}{[H_2Q^+]} \quad (5)$$

$$k_{22} = \frac{[Q^-] [H^+]}{[HQ^\pm]} \quad (6)$$

Na tabela 3 são apresentados os valores das constantes de ionização presentes na literatura para a fluoroquinolona em estudo. [12]

Tabela 3 – Constantes de equilíbrio da Moxifloxacina.

	pK_1	pK_2	pK_{11}	pK_{12}	pK_{21}	pK_{22}

Moxifloxacina	6,25 ± 0,02	9,29 ± 0,04	7,46	8,08	6,29	9,25
----------------------	-------------	-------------	------	------	------	------

Tal como já foi referido, a atividade antibacteriana das fluoroquinolonas é dependente do pH. Se por um lado a existência de grupos protonados é necessária para melhorar a atividade biológica e a solubilidade em fluidos biológicos, a existência de grupos não ionizados permite a partição destes antibióticos em meios lipofílicos, como as membranas das células bacterianas, melhorando as suas propriedades farmacocinéticas. [31]

Desta forma, o conhecimento das propriedades físico-químicas é um passo essencial para perceber quais são as relações entre estrutura e atividade e, assim, perceber o comportamento das fluoroquinolonas em sistemas *in vivo*. [31]

3. Mecanismo de Ação das Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas atuam através da inibição de duas enzimas envolvidas na síntese do ADN bacteriano – a ADN girase e a topoisomerase IV. Ambas as enzimas são ADN topoisomerases, que as células humanas não possuem, mas que são essenciais na replicação e transcrição do ADN bacteriano. [2, 13]

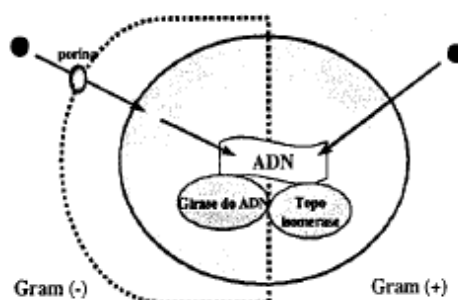


Figura 4 – Mecanismo de Ação das Fluoroquinolonas.

Para se acomodar no interior da célula bacteriana, a hélice do ADN de um organismo é enrolada várias vezes e, em seguida, enrolada na direção oposta à da dupla hélice, criando um superenrolamento negativo. A função da ADN girase é introduzir este superenrolamento negativo, convertendo o ADN relaxado numa estrutura organizada. [9, 13]

A ADN girase é um tetrâmero constituído por duas subunidades GyrA e duas subunidades GyrB, sendo que a primeira subunidade é responsável pela quebra das

cadeias-mãe do ADN e posterior união dessas cadeias, enquanto que a subunidade GyrB promove o superenrolamento negativo. A topoisomerase IV tem uma estrutura semelhante e é composta por duas subunidades ParC e duas subunidades ParE. [2, 9, 11]

Além da ADN girase, as fluoroquinolonas inibem a atividade da topoisomerase IV, que tem a função de separar as cadeias-filha de ADN durante a divisão celular. Enquanto que a ADN girase é o alvo das fluoroquinolonas nas bactérias Gram-negativas, a topoisomerase IV é o alvo primário da atividade das fluoroquinolonas nos organismos Gram-positivos. [1, 9]

As fluoroquinolonas interrompem a união das cadeias de ADN, através da formação de um complexo ternário fluoroquinolona – enzima - ADN, causando a morte rápida das células bacterianas. [1, 9, 11]

4. Mecanismo de Resistência Bacteriana

A resistência às fluoroquinolonas desenvolve-se a partir de dois mecanismos principais que envolvem mutações espontâneas nos genes bacterianos. [2, 9]

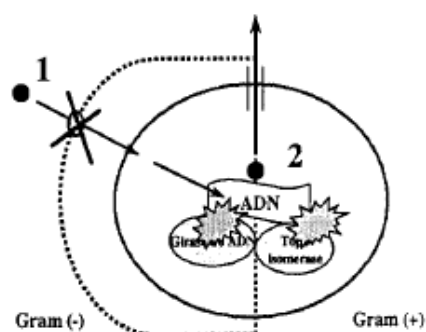


Figura 5 – Mecanismo de Resistência Bacteriana por: 1 – Mutações dos canais de permeabilidade ou 2 – Mutações das topoisomerases.

Um dos mecanismos envolve mutações nas topoisomerases, causando a diminuição da afinidade do antibiótico à enzima. Estas mutações têm efeitos específicos para as fluoroquinolonas e conferem um elevado nível de resistência bacteriana a estes fármacos. [9]

O transporte de fluoroquinolonas através das membranas bacterianas ocorre por processos como interação com proteínas transmembranares, difusão simples ou através das porinas. As mutações nos canais de permeabilidade (ou porinas) e nas bombas de efluxo são o segundo mecanismo que confere resistência bacteriana às

fluoroquinolonas que, conseqüentemente, vão originar uma diminuição na acumulação de fármaco no meio intracelular. [1, 9]

5. Complexação das Fluoroquinolonas com Catiões de Metais

O uso excessivo e indevido das fluoroquinolonas originou um aumento da resistência bacteriana a esta classe de antibióticos, comprometendo a sua eficácia como agentes antimicrobianos. [35]

A resistência microbiana aos antibióticos levou à criação de fármacos novos e modificados. Neste contexto, o conceito de coordenação de metais às fluoroquinolonas ganhou interesse como uma estratégia para aumentar a atividade biológica destes fármacos, reduzir os efeitos adversos e neutralizar a resistência bacteriana, originando os metaloantibióticos. [14, 15]

Os iões metálicos possuem um importante papel no mecanismo de ação dos metaloantibióticos e estão envolvidos em interações específicas entre estes fármacos com diversas biomoléculas (proteínas, membranas, ADN, entre outros). [16] Estes iões coordenam-se às fluoroquinolonas através dos átomos de oxigénio dos grupos ácido carboxílico (posição 3) e cetona (posição 4), levando à formação dos complexos binários metal-fluoroquinolona. Além destes complexos, a coordenação metal-fluoroquinolona-1,10-fenantrolina (complexos ternários) também tem sido uma hipótese na criação metaloantibióticos mais estáveis em solução e com maior atividade biológica, comparativamente aos complexos binários. [17, 18]

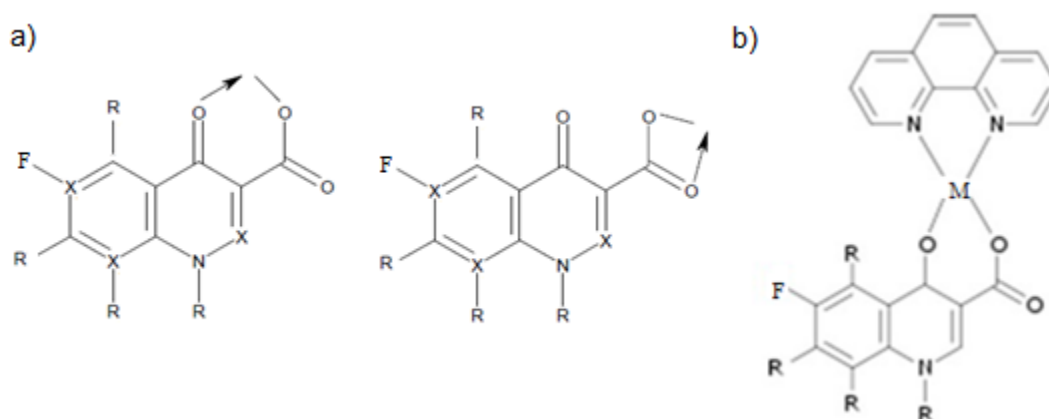


Figura 6 – Modos de coordenação dos metais às fluoroquinolonas a) para os complexos binários e b) para os complexos ternários.

Numerosos estudos têm sido efetuados para avaliar a capacidade de interação entre as fluoroquinolonas e os cátions metálicos, destacando-se aqueles com metais essenciais como o cobre, zinco, níquel e magnésio. [37, 38, 39, 40, 53]

Em particular, os estudos da interação entre fluoroquinolonas e o cátion Cu^{2+} têm tido maior destaque por este íon metálico ser relevante em muitos processos biológicos e ser um constituinte de vários compostos administrados em seres humanos. [35, 50] Além destas características, os complexos entre cobre e fluoroquinolonas têm apresentado especial interesse como potenciais agentes antimicrobianos devido à sua elevada afinidade ao ADN bem como inibidores de enzimas. Também o sistema Cu^{2+} /Phen tem sido alvo de vários estudos por apresentar propriedades de clivagem do ADN bacteriano. [35, 55]

Desta forma, vários estudos dos complexos FQ/ Cu^{2+} /Phen têm sido realizados para avaliar a potencialidade destes complexos como agentes antibacterianos, sendo esta uma das principais estratégias no combate à resistência bacteriana. [35]

Sendo também um dos principais metais essenciais no corpo humano, o ferro tem sido usado em vários estudos de interação com fluoroquinolonas, de forma a avaliar o modo de ligação metal-fluoroquinolona e as propriedades biológicas deste complexo. [41, 42, 43, 52]

Embora o papel do ferro nas células bacterianas seja conhecido por influenciar a composição celular, a atividade enzimática e por estar envolvido em processos como o transporte de oxigénio e a síntese de ADN [44], o seu comportamento em solução quando complexado com fluoroquinolonas, sob a forma de complexos binários ou ternários, tem sido pouco relatado. Como tal, neste trabalho foram estudados os complexos binário e ternário entre o íon Fe^{3+} e a fluoroquinolona Moxifloxacina, de forma a entender o seu comportamento em solução para posteriores estudos de interação e localização membranar.

6. Membranas biológicas

A membrana celular bacteriana é uma importante estrutura pois mantém a forma da célula e protege-a de uma eventual rutura. A membrana é constituída maioritariamente por peptidoglicano, uma rede de moléculas de polissacarídeos unidos por ligações peptídicas cruzadas. [45]

Em algumas bactérias, o peptidoglicano constitui uma rede espessa e complexa em torno da membrana plasmática da célula. Este tipo de bactérias designa-se por *Gram-positivas*. Outras bactérias possuem uma camada fina de peptidoglicano que se encontra entre a membrana celular e a membrana plasmática. Estas bactérias designam-se por *Gram-negativas*. [46]

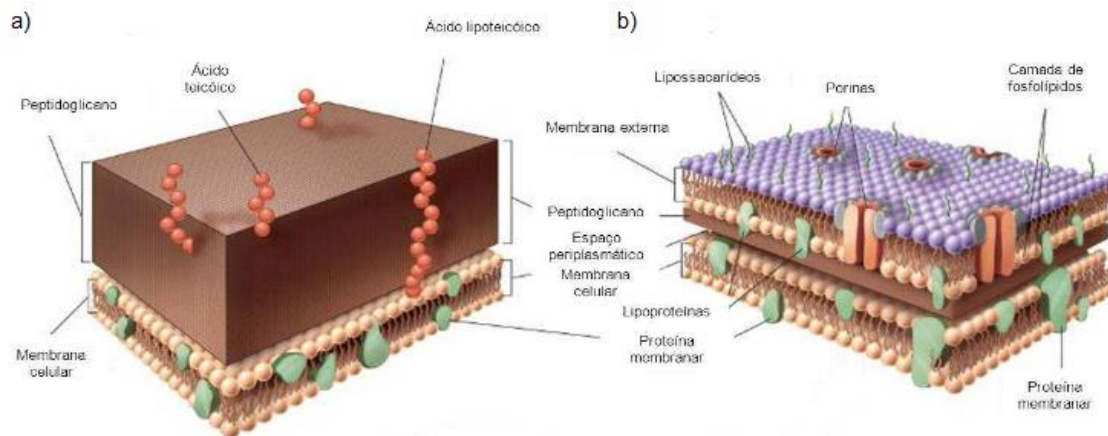


Figura 7 – Estrutura típica da membrana de bactérias a) Gram-positivas e b) Gram-negativas.

A membrana plasmática das células bacterianas é composta principalmente por 65-75% de fosfolípidos e 6-9% de proteínas. Além disso, a estrutura da membrana é estabilizada por pontes de hidrogénio e por interações hidrofóbicas e os catiões como Mg^{2+} e Ca^{2+} ajudam a estabilizar a membrana através da formação de ligações iónicas com as cargas negativas dos fosfolípidos. [19]

A fosfatidiletanolamina e o fosfatidilglicerol são os principais componentes lipídicos das membranas bacterianas. Por exemplo, a membrana interna da *E. coli* contém 70-80% de PE, 20-25% de PG e <5% de cardiolipina. Pelo contrário, as concentrações de PE e PG nas membranas dos mamíferos são mais baixas, sendo a fosfatidilcolina (PC) o maior componente lipídico. [19, 20]

Já no caso das proteínas, estas podem ser consideradas proteínas periféricas ou integradas. As proteínas periféricas ou extrínsecas estão associadas às membranas por interações proteína-proteína através de ligações eletrostáticas fracas. As proteínas integradas ou intrínsecas encontram-se no interior da camada fosfolipídica, podendo

atravessar a membrana de um lado ao outro, sendo então designadas por proteínas transmembranares. [19]

Devido à sua estrutura complexa, a membrana externa das células bacterianas é a principal barreira de permeabilidade para as quinolonas acederem ao seu local alvo e desenvolverem a sua atividade antibacteriana. Estes fármacos podem alcançar o meio intracelular por diferentes vias, nomeadamente através das proteínas transmembranares, das porinas e/ou por difusão simples, dependendo das características hidrofílicas/lipofílicas do antibiótico. Por exemplo, pelo facto das membranas das células bacterianas serem constituídas maioritariamente por fosfolípidos aniónicos, ao contrário das membranas celulares dos mamíferos que são constituídas por fosfolípidos neutros, a sua afinidade por fármacos é maior, facilitando o tratamento de infeções microbianas e não afetando as células dos mamíferos. [3, 21, 22, 23, 24]

Para entender as interações que ocorrem entre as quinolonas e as membranas celulares, tanto das bactérias como dos mamíferos, são utilizados sistemas que mimetizam estes tipos de membranas, tais como os lipossomas.

6.1. Lipossomas

Os fosfolípidos são moléculas anfifílicas, isto é, uma parte da molécula é hidrofílica e outra parte é hidrofóbica. Quando estas moléculas estão em contacto com um meio aquoso, as interações entre os segmentos hidrofóbicos e o solvente são desfavoráveis e, conseqüentemente, os fosfolípidos reorganizam-se em estruturas ordenadas que minimizam estas interações, tais como os lipossomas. [25, 26, 28, 47]

Os lipossomas são vesículas esféricas microscópicas, com dimensões na gama 30nm a alguns micrómetros, que encerram no seu interior uma fração de solução aquosa. Estas vesículas têm a forma de bicamada e são constituídas por lípidos naturais e/ou sintéticos, nomeadamente fosfolípidos e esfingolípidos, mas também podem ser constituídas por colesterol. [25, 27, 28, 29]



Figura 8 – Estrutura dos lipossomas.

Por serem vesículas biocompatíveis e biodegradáveis tornam-se adequados para estudos biomédicos. Além destas características e do facto dos lipossomas serem capazes de armazenar e solubilizar tanto materiais hidrofílicos como hidrofóbicos, estes sistemas têm sido usados como veículos de transporte de fármacos e como sistemas miméticos das membranas biológicas. [28]

Neste trabalho foram utilizados os sistemas lipídicos dimiristoílfosfatidilcolina (DMPC), como sistema mimético das membranas biológicas dos mamíferos, e extrato total de *Escherichia Coli*, como sistema mimético das membranas de bactérias Gram-negativas. Além disso, este tipo de bactéria é um dos principais causadores de infeções, cujo tratamento consiste na administração da fluoroquinolona Moxifloxacina.

6.1.1. Características dos Lipossomas

Dependendo do método de preparação utilizado, os lipossomas podem apresentar vários tamanhos e serem constituídos por uma ou mais bicamadas, sendo classificados por vesículas unilamelares *pequenas* (SUV's: 20 – 100 nm), *grandes* (LUV's > 100 nm) ou *vesículas multilamelares* (MLV's > 500 nm). [25, 28, 29, 48]

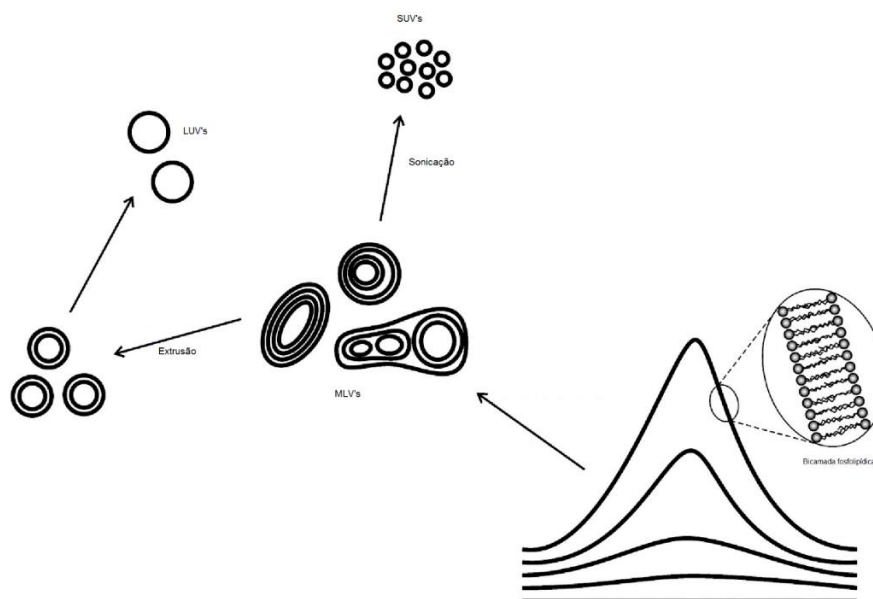


Figura 9 – Representação esquemática dos diferentes tipos de lipossomas.

Dos vários métodos utilizados na preparação de lipossomas, o método de hidratação do filme lipídico é o mais simples e usado na preparação de MLV's, apesar de ser um processo moroso. [25, 47]

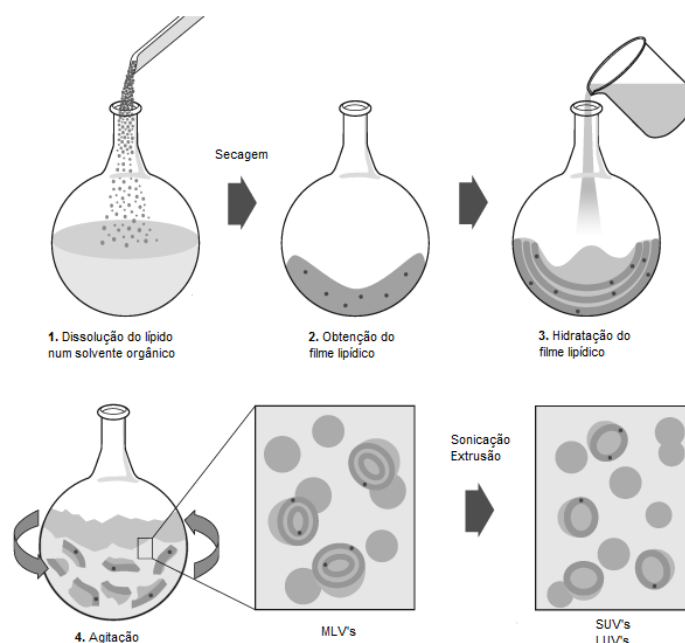


Figura 10 – Representação esquemática do método de hidratação do filme lipídico.

Neste método, o filme lipídico é hidratado com uma solução tampão, produzindo uma população heterogénea de MLV's. Este filme lipídico é, posteriormente, sujeito a processos sonicação ou extrusão originando SUV's ou LUV's, respetivamente. [25, 28, 47]

É importante referir que, para a obtenção de MLVs, é necessária uma temperatura de aquecimento superior à temperatura de transição dos fosfolípidos que constituem o sistema lipídico. A temperatura de transição consiste na passagem de fase gel, onde as cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípidos se encontram num estado ordenado, para a fase cristal-líquido, onde as cadeias hidrocarbonadas se encontram em movimentos mais livres. [26, 29, 49]

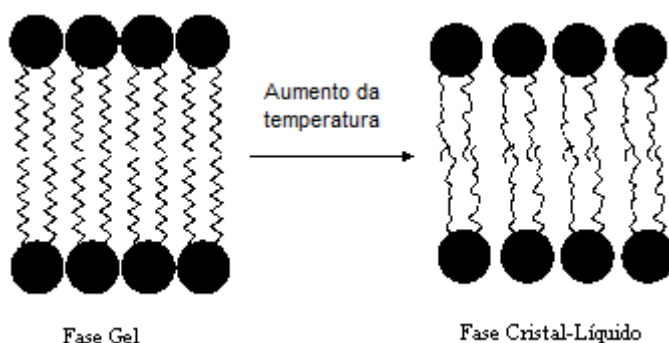


Figura 11 – Representação esquemática da transição de fases dos fosfolípidos.

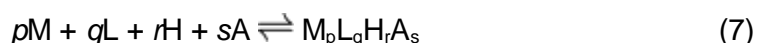
Assim, se a temperatura do sistema for superior à T_m , as cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípidos encontram-se desordenadas, aumentando a fluidez da bicamada, sendo uma das principais características das membranas bacterianas e, por esta razão, os lipossomas são utilizados como modelos miméticos destes sistemas biológicos. [26, 49]

7. Métodos Experimentais

7.1. Constantes de Estabilidade

As constantes de estabilidade são uma importante ferramenta que ajudam a determinar as propriedades das reações entre metais e fluoroquinolonas, em meio aquoso e em sistemas biológicos. A determinação destas constantes permite avaliar se o metaloantibiótico é, ou não, estável em solução e, consequentemente, se pode ser utilizado em estudos posteriores.

Para perceber qual o comportamento das soluções de complexos entre a Moxifloxacina e Ferro(III), na ausência e na presença do ligando 1,10-Fenantrolina, foi utilizada a técnica de espectroscopia de ultravioleta-visível. Para tal foram determinadas as constantes de estabilidade destes complexos através das seguintes equações:



$$\beta_{pqrs} = \frac{[M_p L_q H_r A_s]}{[M]^p [L]^q [H]^r [A]^s} \quad (8)$$

onde M é o metal Fe(III), L é a fluoroquinolona Moxifloxacina, na forma aniónica, H representa o protão e A representa o ligando 1,10-Fenantrolina. [51, 54]

Neste estudo, a determinação das constantes de estabilidade permitiu perceber qual dos complexos, binário ou ternário, era mais estável em solução e a pH fisiológico e, consequentemente, qual destes complexos poderia ser utilizado nos estudos seguintes.

7.2. Estudos de interação membranas

7.2.1. Determinação de coeficientes de partição membranas

O sistema bifásico octanol-água é o sistema tradicional para a determinação dos coeficientes de partição. No entanto, este sistema tem sido substituído por modelos lipossómicos uma vez que o octanol não fornece um ambiente similar ao das membranas celulares. Por outro lado, os modelos lipossómicos permitem estabelecer interações hidrofóbicas, eletrostáticas e ligações de hidrogénio com os fármacos, devido à natureza anfífilica dos fosfolípidos, características semelhantes às membranas celulares. Além disso, ao efetuarem estas interações ao nível da membrana, os fármacos podem exercer o seu poder antimicrobiano, de modo a combater várias infeções bacterianas. [36, 56]

Devido às suas propriedades anfífilicas, os lipossomas podem transportar moléculas hidrofóbicas, hidrofílicas ou mesmo moléculas anfipáticas. No entanto, estas moléculas são transportadas por zonas diferentes na bicamada, dependendo da sua lipofilia. Assim, moléculas mais lipofílicas são transportadas por uma via hidrofóbica, ou seja, através das cadeias hidrocarbonadas, enquanto que, moléculas mais hidrofílicas são transportadas por uma via hidrofílica, isto é, em contacto com a cabeça polar. As moléculas anfipáticas interagem tanto com a zona hidrofílica como com a zona lipofílica da bicamada dos lipossomas. [21, 58]

O facto de diversas moléculas de fármacos, como as fluoroquinolonas, passarem a barreira membranas para atuarem nos seus alvos citológicos promove o estudo das interações entre fármaco e membrana não só para perceber qual o mecanismo de ação do antibiótico, mas também para perceber e combater a resistência bacteriana. Para tal, o primeiro passo deve consistir na determinação do coeficiente de partição, através da quantificação do fármaco nas fases aquosa e membranas. Após a determinação do

coeficiente de partição, outros estudos, como os estudos de localização membranar, podem ser efetuados. [21, 36]

O coeficiente de partição de qualquer composto entre suspensões lipossômicas e o meio aquoso é definido por:

$$K_p = \frac{\left(\frac{C_l}{C_t}\right) / [L]}{\left(\frac{C_{aq}}{C_t}\right) / [Aq]} \quad (9)$$

onde C_l é a concentração molar do fármaco no meio lipídico, C_{aq} representa a concentração molar do fármaco no meio aquoso, C_t a concentração molar total do fármaco, $[Aq]$ e $[L]$ representam as concentrações molares da água e do lípido, respetivamente. [21]

Os dados obtidos pela espectroscopia de fluorescência foram analisados através da seguinte equação:

$$\Delta I = \frac{\Delta I_{\max} K_p [L]}{[W] + K_p [L]} \quad (10)$$

onde I é a intensidade de fluorescência do fármaco na presença das vesículas lipossômicas e I_0 é a intensidade de fluorescência medida na ausência de lípido. $\Delta I_{\max} = I_{\infty} - I_0$, onde I_{∞} é o valor limite de I . [21]

Neste estudo, o complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina possui propriedades fluorescentes que possibilitam a determinação do coeficiente de partição nos dois modelos membranares (extrato total de *E.coli* e DMPC) através da espectroscopia de fluorescência, sem a utilização de sondas fluorescentes externas.

7.3. Estudos de localização membranar

7.3.1. Fluorescência

A luminescência é um fenómeno onde ocorre emissão de luz por alguma substância devido à transição eletrónica do estado excitado para o estado fundamental. Este fenómeno é dividido em duas categorias: a fluorescência e a fosforescência. A fluorescência refere-se à emissão de luz a partir de um estado excitado singlete, no qual o eletrão excitado não muda a orientação de spin, continuando desemparelhado. Já a fosforescência é a emissão de luz a partir de um estado excitado tripleto, no qual o eletrão excitado muda a orientação de spin, ficando emparelhado com o eletrão que permaneceu no estado fundamental. [32, 33]

Os processos que ocorrem entre a absorção e a emissão de radiação são geralmente ilustrados pelo diagrama de Jablonski. [32, 33]

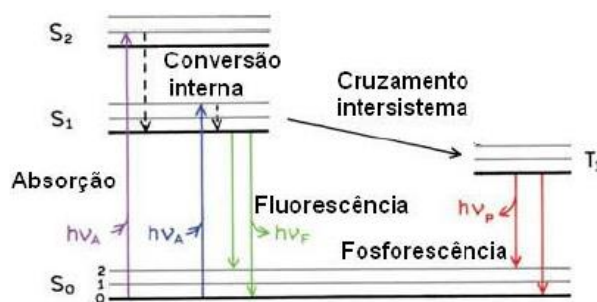


Figura 12 – Diagrama de Jablonski.

Este diagrama é uma ferramenta importante para a descrição dos processos envolvidos na absorção e na emissão de radiação, tais como absorção de um fóton, conversão interna (retorno direto ao estado fundamental sem emissão de fluorescência), cruzamento intersistema (possivelmente seguido por emissão de fosforescência), fosforescência e fluorescência. [32, 33]

7.3.2. Extinção de Fluorescência

A extinção de fluorescência, ou *quenching* de fluorescência, refere-se a um processo particular do fenómeno de fluorescência que envolve a perda de energia de uma molécula no estado excitado por emissão de luz. Esta diminuição da intensidade de fluorescência pode dever-se a uma variedade de interações moleculares entre o fluoróforo (molécula que possui intensidade de fluorescência) e o *quencher* (agente de extinção de fluorescência). Estas interações moleculares incluem reações no estado excitado, formação de um complexo no estado fundamental, rearranjos moleculares, transferência de energia e colisões moleculares. [32, 33]

Há uma variedade de substâncias que atuam como agentes de extinção de fluorescência. Um dos principais *quenchers* é o ião iodeto, cujo processo de *quenching* de fluorescência advém da passagem do sistema para um estado excitado tripleto, promovido por um acoplamento spin-órbita entre o estado excitado (singlete) do fluoróforo e o halogénio. Como a emissão a partir do estado tripleto é lenta, a extinção de fluorescência é favorecida. [32]

O processo de extinção de fluorescência pode dividir-se em dois tipos: *quenching* dinâmico ou *quenching* estático. Em ambos os casos ocorre interação entre o fluoróforo e o *quencher*. [32, 33]

No caso do *quenching* dinâmico, o *quencher* difunde-se com o fluoróforo, quando este se encontra no estado excitado. Após o contacto, o fluoróforo volta ao seu estado fundamental, sem ocorrer nenhuma alteração na molécula. [32, 33]

No caso do *quenching* estático, o processo de extinção de fluorescência ocorre devido à formação, no estado fundamental, de um complexo não-fluorescente entre o fluoróforo e o *quencher*. Quando absorve radiação, o complexo volta ao estado fundamental, sem a emissão de um fóton. [32, 33]

Os dois tipos de *quenching* são descritos pela equação de Stern-Volmer:

$$\frac{IF_0}{IF} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (11)$$

onde IF_0 e IF representam as intensidades de fluorescência do fluoróforo na ausência e na presença do *quencher*; k_q é a constante bimolecular; $[Q]$ é a concentração de *quencher*; τ_0 representa o tempo de vida do fluoróforo, no estado excitado, na ausência do agente de extinção de fluorescência. [32, 33, 59]

O produto entre a constante bimolecular e o tempo de vida ($k_q \tau_0$) traduz a constante de Stern-Volmer e pode ser definida por K_D ou K_S caso a extinção de fluorescência seja dinâmica ou estática, respetivamente. [32, 33]

Os dados obtidos pela extinção de fluorescência são representados por gráficos $IF_0/IF = f([Q])$, obtendo-se uma reta com ordenada de origem de 1 e cujo o declive tem o valor da constante de Stern-Volmer. Um gráfico de Stern-Volmer linear é um indicativo de que uma classe de fluoróforos está igualmente acessível ao *quencher*. [32]

Uma importante característica do *quenching* dinâmico é que, além de uma diminuição da intensidade de fluorescência, ocorre também uma diminuição no tempo de semivida e, por conseguinte:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} \quad (12)$$

Reformulando a equação 11:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV} [Q] \quad (13)$$

onde τ_0 e τ representam os tempos de vida do fluoróforo, no estado excitado, na ausência e na presença do agente de extinção de fluorescência, respetivamente, e $[Q]$ é a concentração de *quencher*. [32, 33]

A extinção de fluorescência tem sido bastante usada como um fenómeno fundamental e como uma fonte de informação de sistemas biológicos. As interações

entre um fluoróforo e um *quencher* são necessárias para que ocorra o processo de extinção de fluorescência, originando várias aplicações deste fenómeno. [32]

Para descrever o processo de extinção de fluorescência podem ser utilizadas técnicas de fluorescência em modo estacionário ou fluorescência resolvida no tempo.

7.3.3. Fluorescência em modo estacionário

Na técnica de fluorescência em modo estacionário, uma amostra é exposta a um feixe de radiação contínua, ocorrendo uma transição eletrónica do estado fundamental para um estado excitado. Quando o eletrão volta ao estado fundamental há emissão de radiação fluorescente. Esta transição do nível vibracional mais baixo do primeiro estado excitado S_1 para o estado fundamental S_0 é descrita pelo espectro de emissão de fluorescência, representado por uma curva de intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão. Uma propriedade importante da fluorescência é que o mesmo espectro de emissão é geralmente observado, independentemente do comprimento de onda de excitação. [32]

A fluorescência em modo estacionário apresenta vantagens em relação a outras técnicas analíticas devido à sua elevada sensibilidade, a gama de análise é maior e o erro das medições é praticamente constante ao longo do intervalo de análise. [32]

Uma das principais utilidades da fluorescência em modo estacionário é o estudo da localização de compostos em modelos membranares. Estes estudos permitem revelar a acessibilidade de fluoróforos a *quenchers* e, desta forma, determinar a localização de sondas em macromoléculas ou avaliar a permeabilidade de proteínas e/ou membranas aos *quenchers*. [32]

Por exemplo, considerando um fluoróforo ligado a um modelo membranar. Se o modelo membranar for impermeável ao *quencher* e se o fluoróforo se encontrar no interior do modelo membranar, não ocorre qualquer tipo de *quenching* e, por esta razão, os estudos de extinção de fluorescência são utilizados para revelar a localização de fluoróforos nas membranas e a sua permeabilidade aos agentes de extinção de fluorescência. [32]

No presente estudo avaliou-se a localização do complexo ternário Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina nos modelos membranares extrato total de *E.coli* e DMPC. Por apresentar propriedades fluorescentes, o metaloantibiótico tem as características de fluoróforo sendo o ião iodeto o agente de extinção de fluorescência. Com a adição do ião iodeto, a intensidade de fluorescência do complexo ternário vai ser mais (ou menos) influenciada, sendo possível determinar a localização do complexo nos modelos membranares. Caso se verifique uma diminuição da intensidade de

fluorescência, isto significa que o metaloantibiótico é afetado pela ação do ião iodeto e, por isso, pode-se dizer que o complexo se encontra à superfície do sistema membranar. Por outro lado, se não se verificarem alterações na intensidade de fluorescência do complexo ternário, isto significa que este se encontra nas camadas mais internas do modelo membranar e, assim, encontra-se “protegido” da ação do *quencher*.

7.3.4. Fluorescência Resolvida no Tempo

A medição das intensidades e tempos de decaimento de fluorescência é realizada através da técnica de fluorescência resolvida no tempo, uma técnica essencial para investigar a estrutura e a dinâmica de moléculas biológicas, obter informações sobre reações intermoleculares ou revelar detalhes sobre o microambiente do fluoróforo. A utilidade desta técnica decorre do facto de muitos fenómenos dinâmicos (como a extinção de fluorescência) desativarem o estado excitado e, consequentemente, influenciam os tempos de semivida. [32]

Nesta técnica é utilizado o método de domínio de tempo que consiste em expor a amostra a uma radiação pulsada, observando-se o seu decaimento de intensidade e, posteriormente, calcular o tempo de semivida do fluoróforo, que reflete o tempo médio que uma molécula permanece no seu estado excitado. Esta intensidade de decaimento é analisada num sistema com velocidade de deteção elevada que permite não só medir a intensidade como a anisotropia numa escala de nanossegundos. [32]

Os tempos de semivida foram determinados baseados no método de contagem de fotões únicos correlacionados no tempo (TCSPC). Este método consiste em excitar a amostra e detetar o tempo de chegada do primeiro fotão emitido. O princípio deste método baseia-se no facto da probabilidade de detetar um fotão único no tempo t , depois de um pulso de excitação, ser proporcional à intensidade de fluorescência naquele tempo. [32]

Os dados obtidos pela técnica de fluorescência resolvida no tempo contêm mais informação do que os obtidos pela técnica de fluorescência em modo estacionário. Com a técnica de fluorescência resolvida no tempo obtém-se o tempo que a molécula permanece no estado excitado, ou seja, o seu tempo de semivida. Desta forma, se uma amostra contém mais que um fluoróforo, os dados obtidos por esta técnica irão demonstrar mais que um tempo de semivida e, assim, é possível distinguir os diferentes fluoróforos existentes no meio. [32]

Por outro lado, se existir apenas um fluoróforo, a técnica de fluorescência resolvida no tempo permite saber se este fluoróforo está presente num ou mais ambientes distintos, já que esta técnica é sensível ao meio que circunda o fluoróforo. [32]

Neste estudo em particular, tal como a técnica anterior, a técnica de fluorescência resolvida no tempo foi utilizada para avaliar a localização do complexo ternário Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina nos sistemas membranares já referidos. Da mesma forma que a variação da intensidade de fluorescência permite avaliar a localização do fármaco nos sistemas membranares, o decaimento dos tempos de semivida também permite perceber se o metaloantibiótico está inserido no meio lipofílico. Uma variação do tempo de semivida do fluoróforo indica que este é influenciado pela ação do *quencher* e, com isto, pode dizer-se que o metaloantibiótico não se encontra inserido no meio lipofílico.

7.3.5. Sondas de fluorescência

Os fluoróforos são divididos em duas categorias: intrínsecos e extrínsecos. Os fluoróforos intrínsecos, como as proteínas contendo resíduos de triptofano, referem-se a fluoróforos que ocorrem naturalmente enquanto que os fluoróforos extrínsecos, como as sondas de fluorescência, são aqueles que são adicionados a uma amostra que não tem as propriedades espectrais desejadas, como os sistemas miméticos das membranas biológicas. [32]

Tipicamente, as membranas não apresentam fluorescência intrínseca. Por esta razão são introduzidas sondas de fluorescência que se particionam espontaneamente na região lipofílica da membrana. [32]

Uma das principais sondas de fluorescência utilizadas em estudos com é a 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno e os seus derivados, como a sonda trimetilamónio-difenil-hexatrieno, devido às suas propriedades espectroscópicas como o elevado rendimento quântico no meio hidrofóbico, intensidade de fluorescência desprezável em meio aquoso e tempos de semivida dependentes das propriedades em solução.

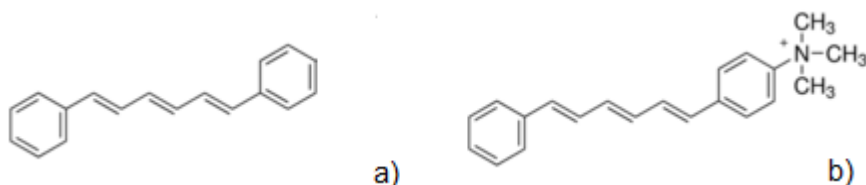


Figura 13 – Estrutura das sondas de fluorescência: a) DPH e b) TMA-DPH.

Devido às diferenças estruturais, estas sondas encontram-se inseridas em regiões distintas nos modelos membranares. Enquanto que a sonda TMA-DPH, devido ao seu

grupo catiónico, se encontra na interface membrana/meio aquoso, a sonda DPH encontra-se imersa no interior da bicamada fosfolipídica.

O facto destas sondas se encontrarem em regiões distintas permite perceber qual a localização de certos agentes externos em sistemas membranares, quando estes agentes interatuam com as sondas, alterando as suas propriedades de fluorescência.

Para entender a interação entre as sondas de fluorescência e um agente externo é necessário calcular a concentração efetiva do agente externo, $[Q]_m$, no modelo lipídico. [58] Para tal é considerada a seguinte equação:

$$[Q]_m = [Q]_t \left(1 - \frac{K_p \gamma_L L}{1 - \gamma_L L + K_p \gamma_L L} \right) \frac{K_p}{1 - \gamma_L L} \quad (14)$$

onde $[Q]_t$ é a concentração total de fármaco, K_p é o coeficiente de partição do fármaco no sistema lipídico, γ_L é o volume molar do lípido e L é a concentração de lípido.

No presente estudo, as sondas de fluorescência foram incorporadas nos dois sistemas lipídicos fornecendo-lhes as características de fluoróforo enquanto que o complexo ternário atua como agente de extinção de fluorescência.

Tal como já foi referido, as sondas de fluorescência permitem avaliar a localização do fármaco nas biomembranas, utilizando a técnica de fluorescência resolvida no tempo. Neste caso, uma variação no tempo de semivida da sonda de fluorescência indica se o metaloantibiótico se encontra à superfície ou no interior das camadas do sistema membranar, caso essa variação se verifique para a sonda TMA-DPH ou DPH, respetivamente.

7.3.6.Efeito de Filtro Interno

O efeito de filtro interno refere-se a um fenómeno onde ocorre uma aparente diminuição da intensidade de fluorescência de um fluoróforo devido à absorção de radiação por parte da matriz da amostra, ou seja, além do fluoróforo existem outras espécies em solução que absorvem radiação ao mesmo comprimento de onda de excitação ou emissão, levando a uma distorção dos dados obtidos pela extinção de fluorescência. [32, 33, 57]

Se o efeito de filtro interno se verificar será necessário corrigir as intensidades de fluorescência. Para evitar a existência deste fenómeno, a solução de fluoróforo deve compreender uma estreita gama de concentrações de maneira a que a sua absorvância seja menor que 0,2 e, assim, a intensidade de emissão de fluorescência do fluoróforo seja diretamente proporcional à sua concentração. [32]

Por outro lado, nas medições dos tempos de semivida, o efeito de filtro interno não é geralmente observado pois estas medições são independentes da intensidade total.

[32]

CAPÍTULO II: Materiais e Métodos

1.Reagentes

A Moxifloxacina foi adquirida à Bayer AG e armazenada ao abrigo da luz.

A 1,10-Fenantrolina, de qualidade *p.a* e grau de pureza $\geq 99,5\%$, foi obtida à Sigma-Aldrich.

O nitrato de ferro (III) nonahidratado, com grau de pureza $\geq 98\%$, foi obtido à Sigma-Aldrich.

Os lípidos, da Avanti Polar Lipids, foram armazenados no congelador (-20°C) e usados sem nenhuma purificação adicional.

O clorofórmio, utilizado na obtenção dos filmes lipídicos, de qualidade *p.a* e grau de pureza $\geq 99,8\%$, foi obtido à Merck.

A solução tampão Hepes foi preparada por pesagem rigorosa do ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N-etanosulfónico e do cloreto de sódio, ambos de qualidade *p.a* e obtidos à Sigma-Aldrich.

O iodeto de potássio, com grau de pureza $\geq 99,0\%$, foi obtido à Panreac AppliChem.

As sondas DPH (adquirida à Sigma) e TMA-DPH (adquirida à Fluka) foram dissolvidas em clorofórmio e metanol, respetivamente, e armazenadas no congelador (-20°C).

2.Instrumentação

As pesagens dos vários compostos foram realizadas nas balanças Analítica Metler AT 201 ($\pm 2 \times 10^{-5}$ g) e Semi – Analítica Metler AE 160 ($\pm 2 \times 10^{-4}$ g).

Para a determinação dos valores de pH foi utilizado um banho termostatzado ($25,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$) da Julabo com uma célula de paredes duplas e um medidor de pH da Crison GLP 22+ com elétrodo combinado de vidro Crison (5029).

Após a hidratação dos vários filmes lipídicos, estes foram vortexados num vortex Janke&Kunkel (VF2) da IKA – Labortechnik TM, de modo a garantir a dissolução completa da suspensão lipossómica.

As suspensões de MLV's foram extrudidas num Extrusor Lipex Biomembranes de capacidade de 10 mL com filtros de policarbonato da Whatman. Para que a temperatura do sistema fosse superior à temperatura de transição dos lípidos foi utilizado um banho termostatzado ligado ao extrusor, de forma a produzirem-se LUV's.

O tamanho das partículas lipossômicas preparadas e a respetiva polidispersão foram determinadas num equipamento de espectroscopia de correlação fotoiônica Zeta Sizer Nano ZS da Malvern Instruments.

Os espectros de absorção das várias soluções foram obtidos num espectrofotómetro UV-3600 da Shimadzu equipado com um controlador de temperatura TCC-Controller da Shimadzu.

Os estudos associados à interação membrana – fármaco foram realizados num espectralfluorímetro Cary Eclipse da VARIAN equipado com um controlador de temperatura Single Cell Peltier Accessory da VARIAN.

As medições de fluorescência resolvida no tempo foram efetuadas num fluorímetro Tempco acoplado a um controlador “single photon counting” (FluoroHub), ambos da Horiba Scientific, com controlo de temperatura efetuado com um banho termostático da marca Julabo. A excitação foi realizada com uma fonte Nano LED de 360nm da Horiba.

3.Determinação espectrofotométrica de constantes de estabilidade

As constantes de estabilidade dos complexos binário e ternário foram determinadas usando a espectroscopia de ultravioleta - visível. As titulações espectrofotométricas foram realizadas usando soluções aquosas contendo Fe(III) e Moxifloxacina nas razões 1:1 e 1:2 ($1,25 \times 10^{-5}M$ – $2,5 \times 10^{-5}M$), para o sistema binário, e uma solução contendo Fe(III), Moxifloxacina e 1,10-Fenantrolina na razão 1:1:1 ($2,5 \times 10^{-5}M$), no caso do sistema ternário. Os ajustes de pH foram realizados por adições vestigiais de HCl e NaOH, obtendo-se valores de pH compreendidos entre 3 e 10.

Os espectros de absorção foram traçados a 25,0°C, em cubas de quartzo com percurso ótico de 1 cm, numa gama de comprimentos de onda entre 225 e 600 nm.

Os valores das constantes de estabilidade obtidos neste estudo correspondem a uma média de um mínimo de três ensaios e foram determinados através do programa HypSpec 2014.

4.Preparação da solução tampão Hepes

Para a preparação de uma solução tampão Hepes 10mM pesou-se rigorosamente o ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N-etanossulfónico (força iónica 0,1M em NaCl), obtendo-se uma solução com pH de 7,4. Esta solução foi armazenada à temperatura ambiente e utilizada como solvente em todas as soluções preparadas.

5.Preparação da solução de complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina

Para os estudos de interação e localização membranar foi preparada uma solução de complexo em solução tampão Hepes, por pesagem rigorosa dos seus componentes, na razão 1:1:1, que posteriormente foi armazenada no frigorífico e ao abrigo da luz.

6.Preparação de lipossomas

Para a obtenção de um filme lipídico, pesou-se o lípido (DMPC ou extrato total de *E.Coli*) e dissolveu-se em clorofórmio. Posteriormente, evaporou-se o solvente orgânico sob uma corrente de árgon, obtendo-se um filme lipídico nas paredes do balão de fundo redondo. Para remover vestígios de solvente orgânico, colocou-se o balão sob uma corrente de vácuo durante um período de 3h.

De seguida, hidratou-se o filme lipídico com solução tampão Hepes 10mM (0,1M em NaCl, pH 7,4). A solução lipídica foi, então, vortexada para garantir a completa dissolução do filme lipídico.

A suspensão lipossómica foi sujeita a cinco ciclos de congelação/descongelação (com azoto líquido e água em ebulição) e, seguidamente, colocada num banho, durante 30 minutos, cuja temperatura era superior à temperatura de transição do lípido.

Após este período, a suspensão de MLV's foi extrudida 10 vezes, através de filtros de policarbonato (com poros de diâmetro igual a 100nm) para se obterem LUV's, no caso do sistema lipídico contendo DMPC. No caso do sistema lipídico contendo extrato total de *E.Coli*, a suspensão de MLV's foi extrudida 5 vezes, através de filtros de policarbonato (com poros de diâmetro igual a 200nm) e, posteriormente, foi extrudida 10 vezes, através de filtros de policarbonato (com poros de diâmetro igual a 100nm). A

temperatura de extrusão foi de 37°C para o sistema DMPC e de 60°C para o extrato total de *E.Coli* e foi utilizada uma pressão de 230 bar.

Para a determinação do diâmetro de lipossomas, e respetiva polidispersão, foi utilizado o equipamento de espectroscopia de correlação fotónica Zeta Sizer, realizando-se as medições a uma temperatura de 37°C.

7.Preparação e doseamento da solução de iodeto de potássio

A solução do agente de extinção de fluorescência foi preparada, em solução tampão Hepes, pesando-se o iodeto de potássio 5M e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10mM, para evitar a formação de I_3^- .

O doseamento desta solução foi realizado através da titulação de uma solução padrão de KIO_3 numa mistura de tetracloreto de carbono e ácido clorídrico.

8.Estudos de interação membranar

Para o estudo da interação entre o complexo ternário Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina e os sistemas DMPC e extrato total de *E.Coli* foi utilizado o método da adição. Para tal, adicionou-se 1,0mL da solução do complexo ternário numa cuba de quartzo com agitação e mediu-se a intensidade de fluorescência desta amostra (A0). De seguida fizeram-se nove adições de um pequeno volume de sistema lipídico à solução de complexo na cuba. Após cada adição, deixava-se incubar durante 6 minutos e media-se a intensidade de fluorescência de cada amostra (A1-A9). A intensidade de fluorescência obtida foi, posteriormente, corrigida devido à diluição associada ao método. A concentração de lípido variou entre 100 e 1000µM.

Os ensaios espectralfluorimétricos foram realizados com velocidade de varrimento de 120nm/min, intervalo de dados de 1nm, fendas de excitação e de emissão de 5nm e à temperatura de 37°C. Os espectros de emissão de fluorescência foram traçados num intervalo de comprimento de onda entre 350 a 600nm, com comprimento de onda de excitação de 339nm.

Os valores dos coeficientes de partição obtidos neste estudo correspondem a uma média de um mínimo de três ensaios e foram determinados através de análises gráfica e matemática realizadas com o programa Origin Pro8.

9. Estudos de localização membranar

9.1. Utilização da fluorescência em modo estacionário

Nos estudos de localização membranar, utilizando a fluorescência em modo estacionário, foram preparados quatro conjuntos de amostras, cada um com onze microtubos com um volume final de 1,5 mL. Três dos conjuntos foram preparados com um volume fixo do complexo ternário ($\sim 4 \times 10^{-6} \text{M}$), um volume adequado de um sistema lipídico (de forma a que, a cada conjunto, correspondesse as seguintes concentrações de suspensão lipídica: 250, 500 e 750 μM) e volumes crescentes da solução do agente de extinção (concentração entre 0 e 0,5 M), perfazendo-se o volume do microtubo com solução tampão Hepes. O último conjunto foi preparado da mesma forma, mas sem a adição da suspensão lipídica. Posteriormente, todas as amostras foram vortexadas durante 1 minuto e incubadas a $37 \pm 0,1^\circ \text{C}$ durante 30 minutos.

De seguida mediu-se a intensidade de fluorescência de cada uma das amostras. Os ensaios espectralfluorimétricos foram realizados com velocidade de varrimento de 120nm/min, intervalo de dados de 1nm, fendas de excitação de 5nm e de emissão de 10nm e à temperatura de 37°C . Os espectros de emissão de fluorescência foram traçados num intervalo de comprimento de onda entre 350 a 600nm, com comprimento de onda de excitação de 339nm.

Os valores das constantes de Stern-Volmer obtidos correspondem a uma média de um mínimo de três ensaios e foram determinados através de análises gráfica e matemática realizadas com o programa Origin Pro8.

9.2. Utilização da fluorescência resolvida no tempo

Nos estudos de localização membranar, utilizando a fluorescência resolvida no tempo, as amostras foram preparadas da mesma forma que na técnica anterior, com a diferença da concentração do complexo ternário ser de $\sim 8 \times 10^{-6} \text{M}$.

De seguida mediram-se os tempos de semivida de cada uma das amostras. Os ensaios foram realizados ao comprimento de onda de excitação de 360nm e ao comprimento de onda de emissão máximo, característico do metaloantibiótico ($\sim 464 \text{nm}$) e fenda de emissão de 16nm.

A análise dos dados obtidos foi realizada usando o programa DAS6 Analysis.

Os valores das constantes de Stern-Volmer obtidos correspondem a uma média de um mínimo de três ensaios e foram determinados através de análises gráfica e matemática realizadas com o programa Origin Pro8.

9.2.1.Utilização de sondas de fluorescência

Nos estudos de localização membranar, utilizando as sondas de fluorescência DPH e TMA-DPH, foi necessário incorporar estas sondas nos sistemas lipídicos. Para isso adicionou-se um volume de sonda fluorescente a cada sistema lipídico, de modo a que a proporção lípido/sonda fosse de 300:1. Esta adição foi realizada antes da evaporação do solvente orgânico, para a obtenção do filme lipídico.

Nestes estudos foram preparadas suspensões lipossômicas (A0 a A9), para uma concentração de lípido de 500 μ M. Estas suspensões foram obtidas por adição do mesmo volume de sistema lipídico a volumes crescentes de solução de Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina, perfazendo-se o volume num microtubo até 1,5mL com solução tampão Hepes. A concentração do complexo ternário variou no intervalo de 2 a 18 μ M.

Após terem sido preparadas, as amostras foram vortexadas durante 1 minuto e incubadas a $37 \pm 0,1$ °C durante 30 minutos. Posteriormente mediram-se os tempos de semivida de cada uma das amostras. Os ensaios foram realizados ao comprimento de onda de excitação de 360nm e ao comprimento de onda de emissão máximo, característico das sondas (~428nm) e fenda de emissão de 8nm.

A análise dos dados obtidos foi realizada usando o programa DAS6 Analysis.

Os valores das constantes de Stern-Volmer obtidos correspondem a uma média de um mínimo de três ensaios e foram determinados através de análises gráfica e matemática realizadas com o programa Origin Pro8.

CAPÍTULO III: Resultados e Discussão

1. Determinação das constantes de estabilidade

1.1. Sistema binário Fe(III)/Moxifloxacina, nas razões 1:1 e 1:2

Para a determinação das constantes de estabilidade do sistema binário Fe(III)/Moxifloxacina, nas razões 1:1 e 1:2, foi utilizado um modelo assumindo os equilíbrios traduzidos pelas seguintes equações químicas:



onde L representa a Moxifloxacina na forma aniónica e H representa o protão.

Para o cálculo das constantes de estabilidade do sistema binário foram consideradas também as constantes de protonação da Moxifloxacina (Tabela 4), bem como os espectros de absorção da Moxifloxacina a diferentes pH (Figura 14).

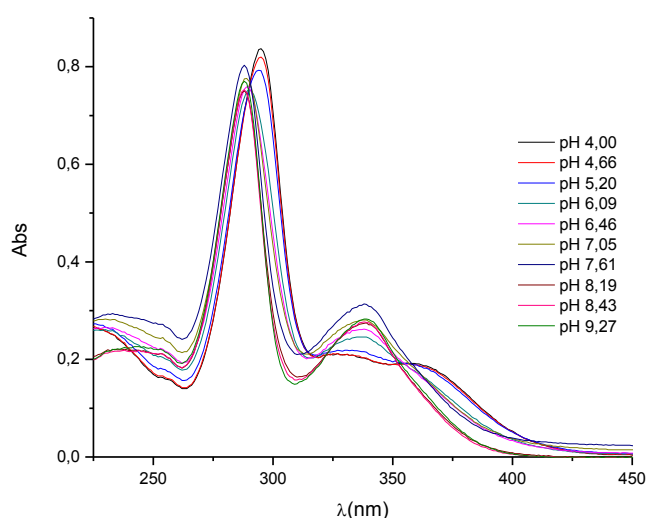


Figura 14 – Espectros de absorção da Moxifloxacina $2,5 \times 10^{-5}\text{M}$ a diferentes pH.

Tabela 4 – Constantes de protonação da Moxifloxacina. [35]

HL^{\pm}	$\log \beta_{0110}$	$9,53 \pm 0,01$
H_2L^{+}	$\log \beta_{0120}$	$15,75 \pm 0,01$

Os valores das constantes de estabilidade do sistema binário Fe(III)/Moxifloxacina foram obtidos através do programa HypSpec 2014 e com os dados espectrais obtidos para o complexo binário nas razões 1:1 e 1:2 (Figuras 15 e 16, respetivamente) e são apresentados na tabela 5.

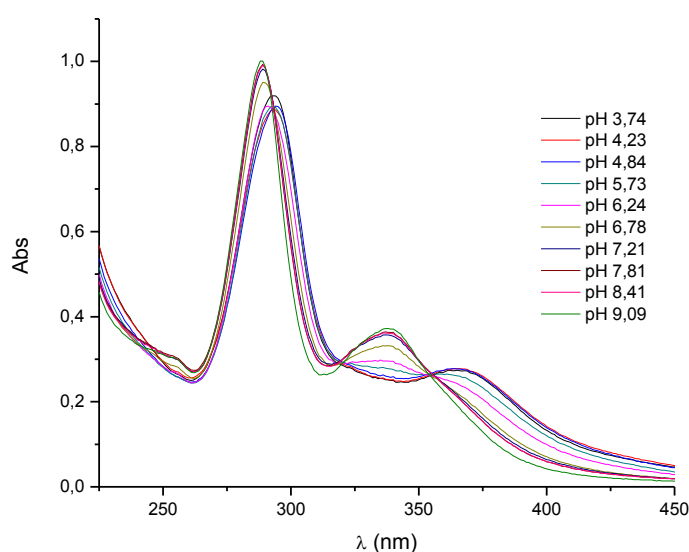


Figura 15 – Espectros de absorção do sistema binário Fe(III)/Moxifloxacina $2,5 \times 10^{-5}M$, na razão 1:1, a diferentes pH.

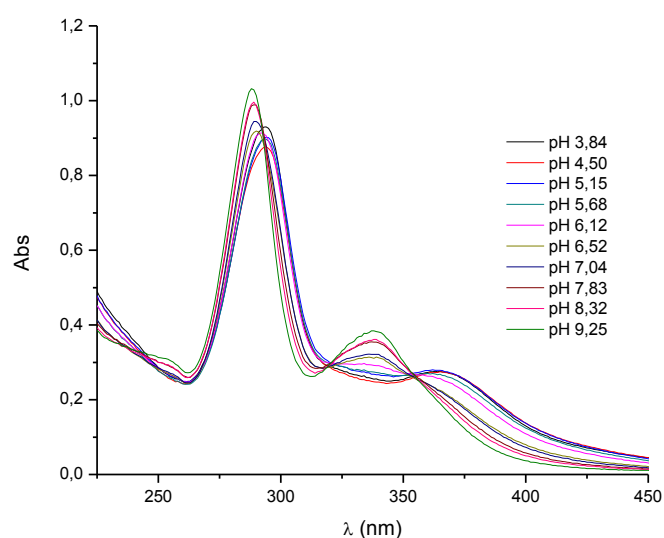


Figura 16 – Espectros de absorção do sistema binário Fe(III)/Moxifloxacina $1,25 \times 10^{-5}M - 2,5 \times 10^{-5}M$, na razão 1:2, a diferentes pH.

Tabela 5 – Constantes de estabilidade determinadas com o programa HypSpec 2014 para o sistema binário Fe(III)/Moxifloxacina (nas razões 1:1 e 1:2).

Fe(III)/Mxfox	$\log \beta_{1100}$	$\log \beta_{1200}$	$\log \beta_{1300}$
	$11,5 \pm 0,2$	$17,8 \pm 0,3$	$30,5 \pm 0,3$

No entanto, não foi possível obter os resultados correspondentes aos equilíbrios 16, 18 e 20.

1.2. Sistema ternário Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina, na razão 1:1:1

Para o cálculo das constantes de estabilidade do sistema ternário Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina, na razão 1:1:1, foi utilizado um modelo assumindo os equilíbrios traduzidos pelas seguintes equações químicas:



onde L representa a Moxifloxacina na forma aniônica, H representa o próton e A representa o ligando 1,10-Fenantrolina.

Para o cálculo das constantes de estabilidade do sistema ternário foram consideradas também as constantes de protonação da Moxifloxacina (Tabela 4), as constantes de estabilidade do sistema binário (Tabela 5), a constante de acidez da 1,10-Fenantrolina e as constantes de estabilidade dos complexos Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina e Fe(III)/1,10-Fenantrolina (Tabela 6), bem como os espectros de absorção da Moxifloxacina (Figura 14), da 1,10-Fenantrolina (Figura 17) e dos complexos Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina e Ferro(III)/1,10-Fenantrolina (Figuras 18 e 19, respetivamente).

Tabela 6 – Constante de acidez da 1,10-Fenantrolina e constantes de estabilidade dos complexos Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina e Fe(III)/1,10-Fenantrolina. [35]

HPhen	$\log \beta_{0011}$	$4,95 \pm 0,02$
LPhen	$\log \beta_{0101}$	$4,38 \pm 0,08$
HLPhen	$\log \beta_{0111}$	$13,11 \pm 0,06$
MPhen	$\log \beta_{1001}$	6,5
MPhen₂	$\log \beta_{1002}$	11,2

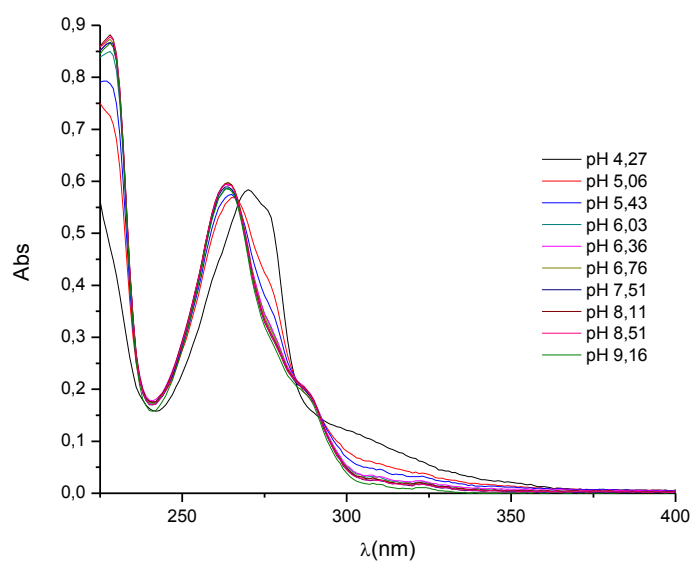


Figura 17 – Espectros de absorção da 1,10-Fenantrolina $2,5 \times 10^{-5}M$, a diferentes pH.

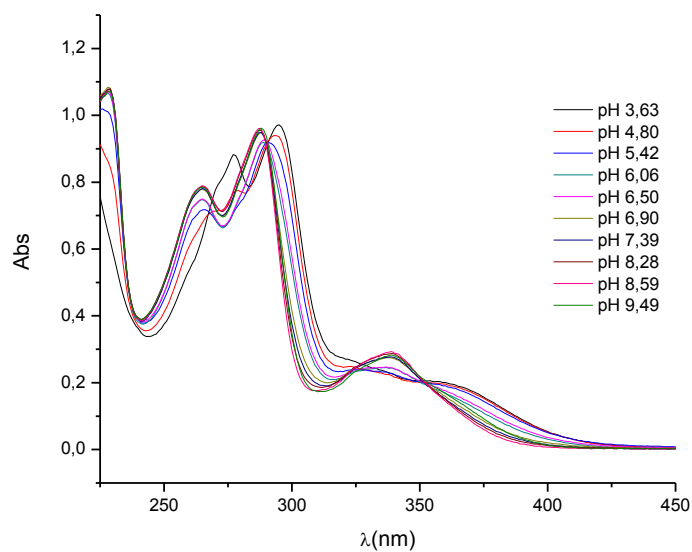


Figura 18 – Espectros de absorção do complexo Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina $2,5 \times 10^{-5}M$, na razão 1:1, a diferentes pH.

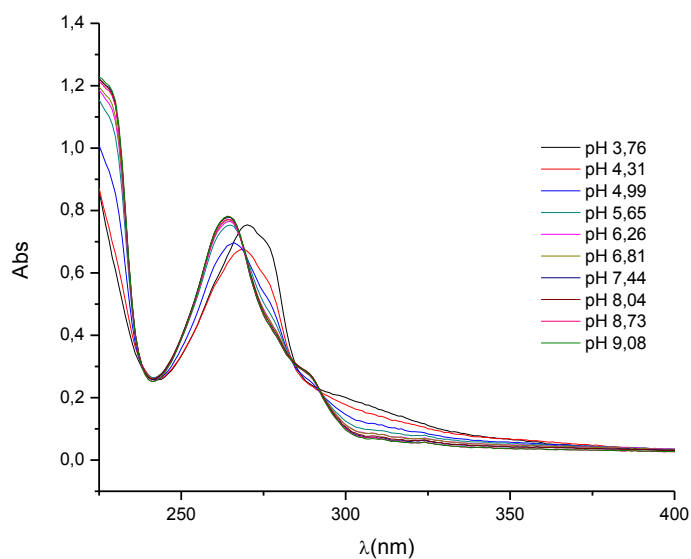


Figura 19 – Espectros de absorção do complexo Ferro(III)/1,10-Fenantrolina $2,5 \times 10^{-5}$ M, na razão 1:1, a diferentes pH.

Os valores das constantes de estabilidade do sistema ternário Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina foram obtidos através do programa HypSpec 2014 e com os dados espectrais obtidos para este complexo na razão 1:1:1 (Figura 20) e são apresentados na tabela 7.

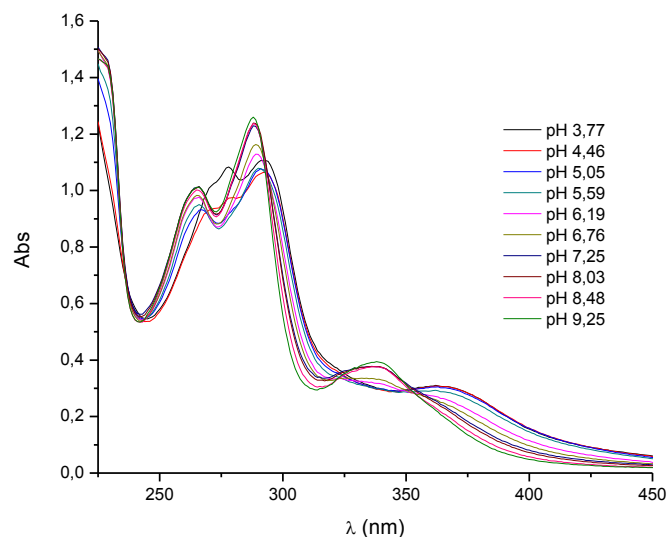


Figura 20 – Espectros de absorção do sistema ternário Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina $2,5 \times 10^{-5}$ M, na razão 1:1:1, a diferentes pH.

Tabela 7 – Constantes de estabilidade determinadas com o programa HypSpec 2014 para o sistema ternário Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina, na razão 1:1:1.

Fe(III)/Mxfx/Phen	$\log \beta_{1101}$	$\log \beta_{1111}$
	$23,4 \pm 0,1$	$29,8 \pm 0,2$

1.3. Diagramas de distribuição de espécies

Os diagramas de distribuição de espécies permitem avaliar qual a distribuição de uma espécie em função do pH. Neste caso determinaram-se quais as espécies predominantes, tanto no complexo binário como no ternário, a pH fisiológico.

Os diagramas de distribuição de espécies foram obtidos a partir das constantes de estabilidade dos dois complexos e com o programa HySS 2008.

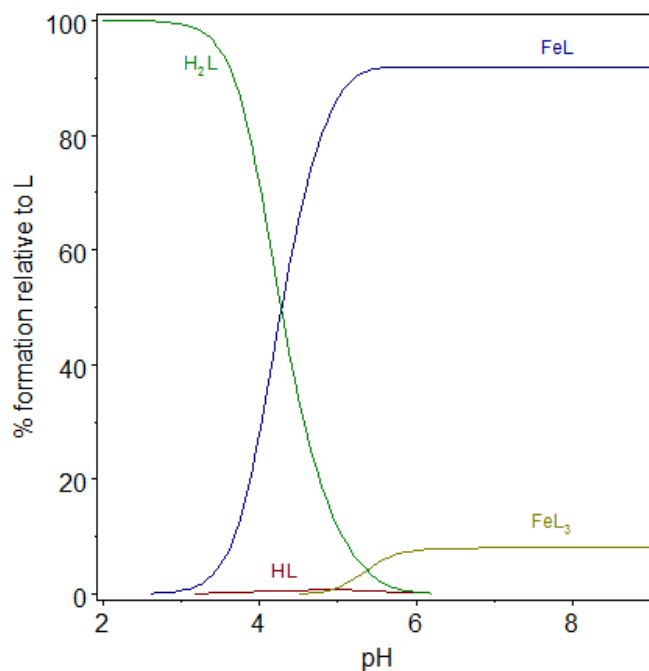


Figura 21 – Diagrama de distribuição de espécies para o complexo Fe(III)/Moxifloxacina, na razão 1:1 ($[\text{Fe(III)}] = 2,5 \times 10^{-5} \text{M}$ e $[\text{Moxifloxacina}] = 2,5 \times 10^{-5} \text{M}$).

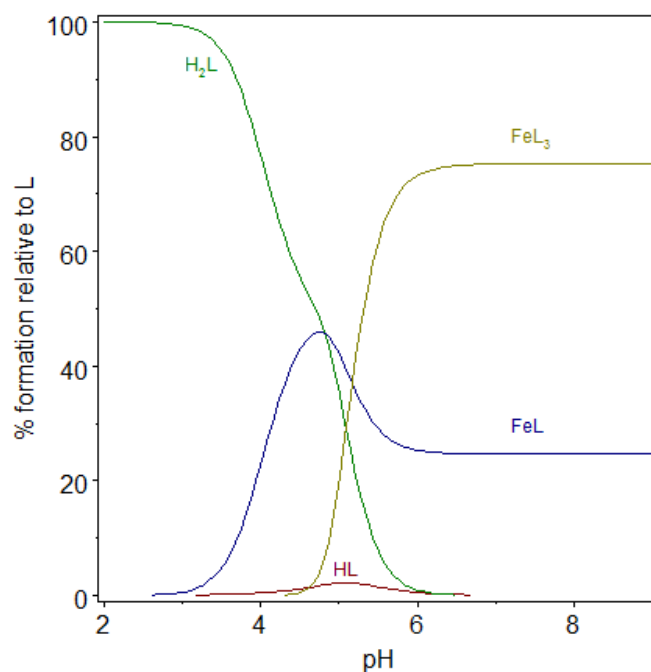


Figura 22 – Diagrama de distribuição de espécies para o complexo Fe(III)/Moxifloxacina, na razão 1:2 ($[\text{Fe(III)}] = 1,25 \times 10^{-5} \text{M}$ e $[\text{Moxifloxacina}] = 2,5 \times 10^{-5} \text{M}$).

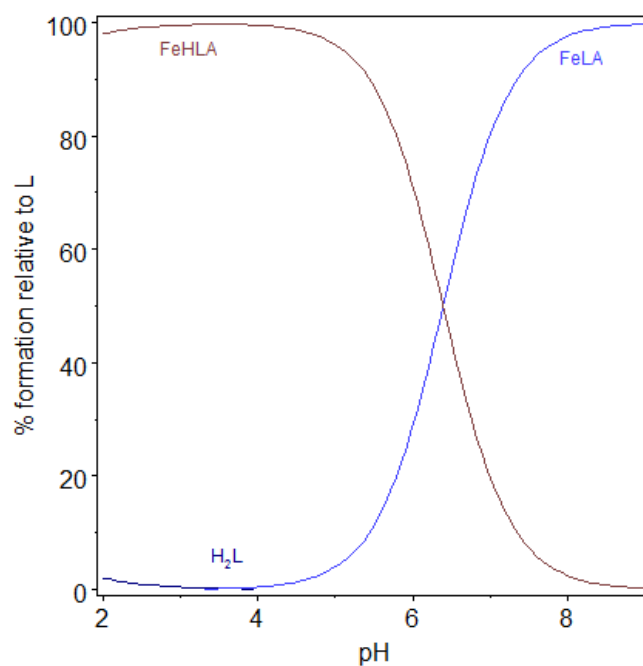


Figura 23 – Diagrama de distribuição de espécies para o complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina ($[\text{Fe(III)}] = 2,5 \times 10^{-5} \text{M}$, $[\text{Moxifloxacina}] = 2,5 \times 10^{-5} \text{M}$ e $[1,10\text{-Fenantrolina}] = 2,5 \times 10^{-5} \text{M}$).

Pela análise dos diagramas de distribuição de espécies verifica-se que a espécie FeL é a mais predominante no caso do complexo binário (~90%) enquanto que a espécie FeLA é a espécie mais abundante no complexo ternário (100%).

1.4. Discussão de resultados

As constantes de estabilidade do sistema ternário Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina são superiores às obtidas para o sistema binário Fe(III)/Moxifloxacina. Pode-se verificar que o valor da constante $\log \beta_{1101}$ obtido para o complexo ternário é duas vezes superior ao valor da constante $\log \beta_{1100}$ obtido para o sistema binário, indicando uma maior estabilidade do complexo ternário por introdução do ligando 1,10-Fenantrolina. Por apresentar uma estabilidade superior em solução, o complexo ternário será usado em detrimento do complexo binário para os seguintes estudos de interação e localização membranar, de forma a avaliar a sua potencialidade como metaloantibiótico.

No caso do sistema binário, o valor das constantes $\log \beta_{1100}$ e $\log \beta_{1200}$ são superiores no sistema binário contendo Fe(III) do que no sistema binário contendo Cu(II) – tabela 8. Isto pode dever-se pelo facto do Fe(III) ter propriedades de um ácido mais duro que o Cu(II). Assim, a coordenação do Fe(III) à Moxifloxacina é feita através de átomos caracterizados por serem bases duras, como os átomos de oxigénio. A coordenação entre um ácido e uma base com propriedades complementares origina uma ligação mais estável e, consequentemente, valores de constantes de estabilidade maiores.

Tabela 8 – Constantes de estabilidade para o sistema binário Cu(II)/Moxifloxacina. [35]

	Cu(II)/Mxfx
$\log \beta_{1100}$	8,21 \pm 0,08
$\log \beta_{1200}$	14,17 \pm 0,04

No caso do sistema ternário Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina verificou-se que este apresenta constantes de estabilidade superiores às dos correspondentes sistemas com Cu(II) – tabela 9. Da mesma forma que no sistema binário, a coordenação do metal à fluoroquinolona é feita através dos átomos de oxigénio, ou seja, uma ligação entre um ácido duro e uma base dura. Assim, a ligação entre o Fe(III) e a Moxifloxacina é mais estável do que com Cu(II) e, consequentemente, os valores das constantes de estabilidade são superiores.

Tabela 9 – Constantes de estabilidade para os sistemas ternários Cu(II)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina. [35]

	Cu(II)/Mxfx/Phen
$\log \beta_{1101}$	17,37 \pm 0,09
$\log \beta_{1111}$	25,48 \pm 0,04

A análise dos diagramas de distribuição de espécies permite concluir que a espécie FeL é a mais predominante no caso do complexo binário (~90%) enquanto que a espécie FeLA é a espécie mais abundante no complexo ternário (100%).

Assim, como a espécie FeLA possui uma maior percentagem de abundância que a espécie FeL e o valor da constante $\log\beta_{1101}$ é, aproximadamente, o dobro do valor da constante $\log\beta_{1100}$, pode-se considerar o complexo ternário como um potencial metaloantibiótico.

Como tal, o complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina foi utilizado nos estudos seguintes para avaliar a sua interação e localização em sistemas membranares.

2. Determinação da lei de Lambert-Beer do complexo ternário Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina

Para determinar qual a gama de concentrações a ser utilizada nos estudos de interação e localização membranar procedeu-se à determinação da lei de Lambert-Beer do complexo ternário, através da espectroscopia de Ultravioleta-Visível. Para tal prepararam-se soluções numa gama de 1×10^{-6} a 2×10^{-5} M, através de diluições sucessivas de uma solução mãe de complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina de concentração $\sim 5 \times 10^{-5}$ M. Posteriormente traçaram-se os espectros de absorção das várias soluções, a pH 7,4 e temperatura de $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (Figura 24).

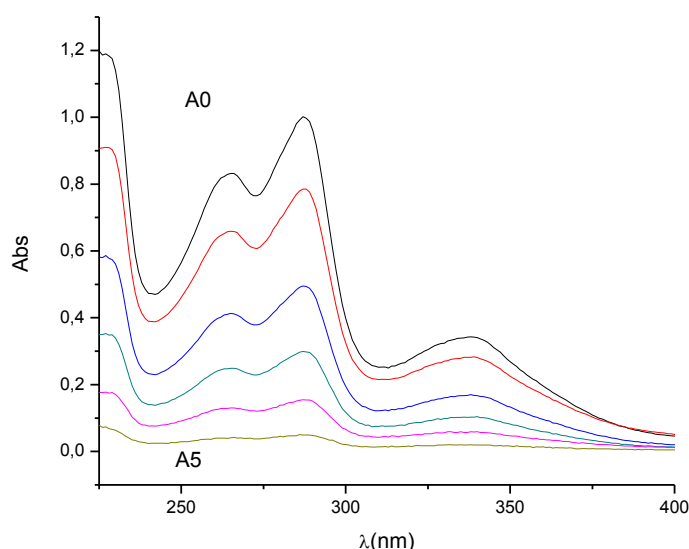


Figura 24 – Espectros de absorção de soluções com concentrações crescentes (M) de complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina: (A0) 2×10^{-5} ; (A1) $1,5 \times 10^{-5}$; (A2) 1×10^{-5} ; (A3) 6×10^{-6} ; (A4) 3×10^{-6} ; (A5) 1×10^{-6} .

Como se pode observar na figura 24, o complexo ternário apresenta 3 bandas a $\sim 265\text{nm}$, $\sim 286\text{nm}$ e $\sim 339\text{nm}$. Estas bandas estão de acordo com as previstas nos espectros de fluoroquinolonas (bandas na gama 270-290nm) e nos espectros dos complexos metal/fluoroquinolona (banda na gama 320-360nm correspondente a uma transferência de carga quinolona – metal). Para minimizar a dispersão de radiação proveniente dos sistemas lipídicos e para minimizar o efeito de filtro interno (ou seja,

absorvância inferior a 0,2) nos estudos de fluorescência optou-se por usar as seguintes concentrações:

Tabela 10 – Gama de concentrações do complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina usadas nos estudos de interação e localização membranar.

		$\lambda_{\text{excitação}}$ (nm)	Complexo /M
Estudos de Interação		339	4×10^{-6}
Estudos de Localização	Fluorescência resolvida no tempo	360	8×10^{-6}
	Fluorescência em modo estacionário	339	4×10^{-6}

3. Diâmetro e Polidispersão de Lipossomas

Nos estudos de interação e localização membranar foram utilizados sistemas lipídicos cujas características se assemelham a membranas biológicas. Para tal foi necessário determinar o diâmetro e polidispersão dos sistemas lipossômicos, de forma a perceber se estes seriam vesículas unilamelares grandes (LUV's).

No caso do sistema lipídico DMPC, as vesículas lipossômicas apresentavam um diâmetro compreendido entre 110 e 120nm, enquanto que as vesículas lipídicas relativas ao sistema extrato total de *Escherichia Coli* apresentavam dimensões entre 130 e 140nm.

Em ambos os casos, a polidispersão dos sistemas lipídicos era menor que 0,1, de maneira a diminuir a dispersão de luz causada pelos lipossomas e, consequentemente, diminuir os erros experimentais.

4. Estudos de interação membranar

Os estudos de interação membranar permitem perceber qual o comportamento de determinada espécie na presença de um modelo membranar. Esta interação é avaliada quantitativamente através da determinação do coeficiente de partição.

Neste trabalho determinaram-se os coeficientes de partição do complexo ternário nos sistemas lipídicos DMPC e extrato total de *E.coli* e, a partir desses resultados, caracterizou-se a interação do metaloantibiótico com os dois modelos membranares.

4.1. Determinação do coeficiente de partição do complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina em lipossomas de extrato total de *E.coli*

Para a determinação do coeficiente de partição do complexo ternário no sistema membranar *E.coli* T foi necessário traçar o espectro de emissão de fluorescência do metaloantibiótico na ausência (A0) e presença de concentrações crescentes de lípido (A1-A9).

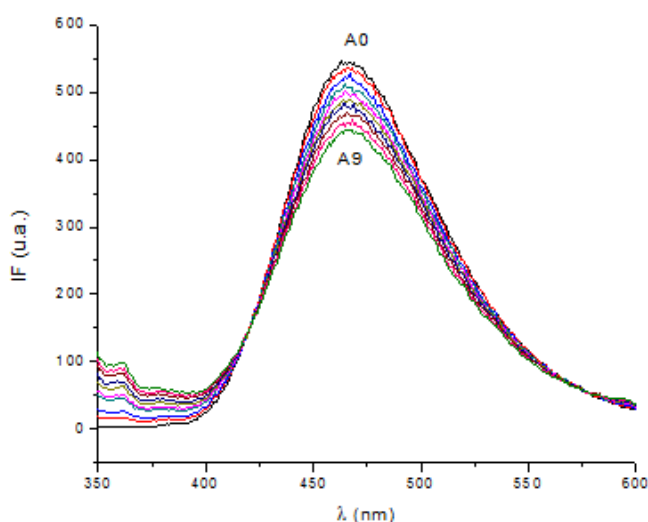


Figura 25 - Espectro de emissão de fluorescência do complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina na ausência (A0) e na presença (A1 a A9) de concentrações crescentes (μM) do sistema lipídico extrato total de *E.coli*: (A1) 119; (A2) 236; (A3) 352; (A4) 465; (A5) 577; (A6) 687; (A7) 795; (A8) 902; (A9) 1008.

O valor do coeficiente de partição foi obtido através do ajuste não linear da equação (10) aos dados experimentais obtidos. Para isso efetuou-se a representação gráfica $\Delta I = f[E.coli\ T]$, apresentada na figura 26.

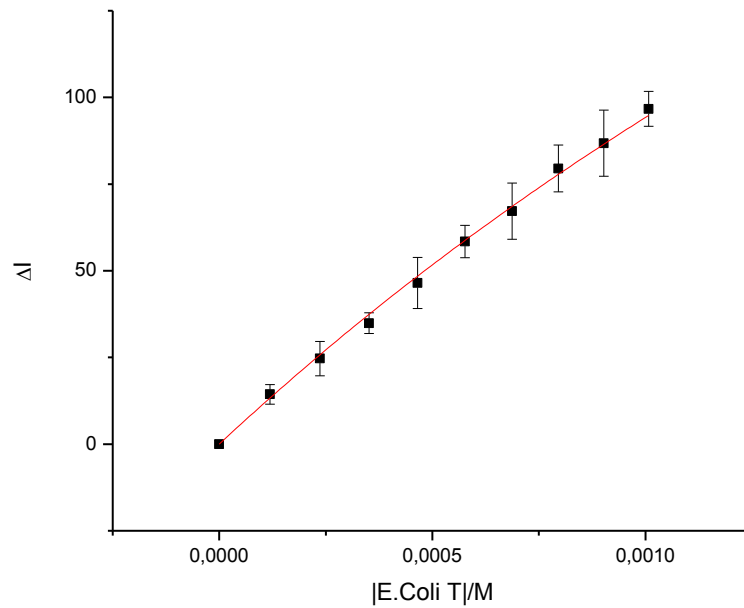


Figura 26 - Representação gráfica $\Delta I = f([E.coli\ T])$ para obtenção do coeficiente de partição.

O valor obtido para o coeficiente de partição do complexo ternário em lipossomas de extrato total de *E.coli* é apresentado na tabela 11.

Tabela 11 – Valor do coeficiente de partição e respetivo desvio-padrão.

Sistema lipídico	K_p (M^{-1})
<i>E.coli</i> T	216 ± 2

4.2. Determinação do coeficiente de partição do complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina no sistema DMPC

Tal como no estudo anterior, para a determinação do coeficiente de partição do complexo ternário no sistema membrana DMPC foi necessário traçar o espectro de emissão de fluorescência do metaloantibiótico na ausência (A0) e na presença de concentrações crescentes de lípido (A1-A9).

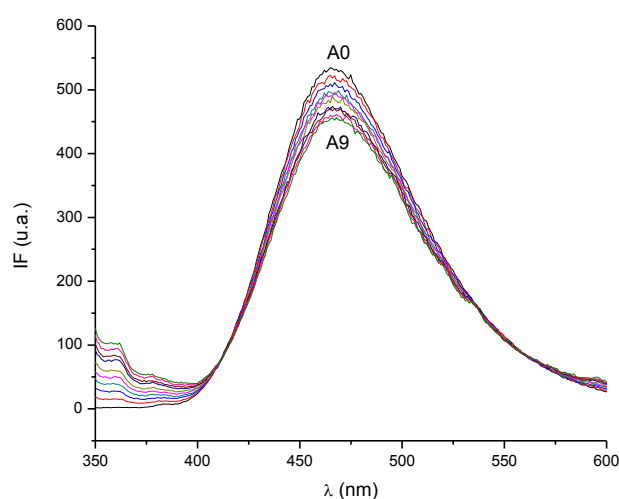


Figura 27 - Espectro de emissão de fluorescência do complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina na ausência (A0) e na presença (A1 a A9) de concentrações crescentes (μM) do sistema lipídico DMPC: (A1) 119; (A2) 236; (A3) 352; (A4) 465; (A5) 577; (A6) 687; (A7) 795; (A8) 902; (A9) 1008.

O valor do coeficiente de partição foi obtido através do ajuste não linear da equação (10) aos dados experimentais obtidos. Para isso efetuou-se a representação gráfica $\Delta I = f[\text{DMPC}]$, apresentada na figura 28.

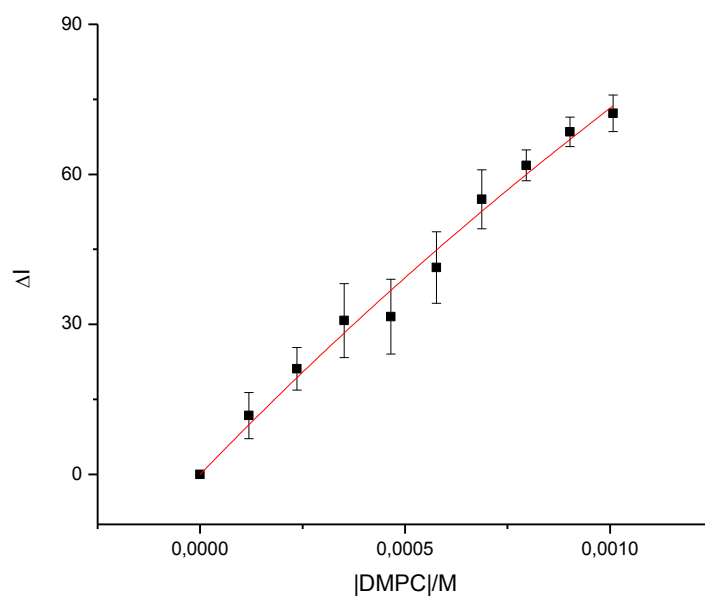


Figura 28 - Representação gráfica $\Delta I = f([DMPC])$ para obtenção do coeficiente de partição.

O valor obtido para o coeficiente de partição do complexo ternário no sistema lipídico DMPC é apresentado na tabela 12.

Tabela 12 – Valor do coeficiente de partição e respetivo desvio-padrão.

Sistema lipídico	K_p (M^{-1})
DMPC	160 ± 3

4.3. Discussão de resultados

Após a obtenção dos resultados concluiu-se que a interação do complexo ternário com o sistema lipídico de extrato total de *E. coli* é maior do que com o modelo membranar DMPC.

O facto de a partição do complexo ternário ser maior num modelo similar à membrana da *E. coli* do que num modelo mimético das membranas celulares dos mamíferos mostra que o metaloantibiótico da Moxifloxacina é um potencial fármaco que interage mais facilmente com as membranas de bactérias Gram-negativas, causadoras de diversas infeções, afetando menos as membranas celulares dos mamíferos.

Analisando os coeficientes de partição presentes na tabela 13 verifica-se que a fluoroquinolona livre possui maiores coeficientes de partição do que os obtidos para o complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina, nos dois sistemas lipídicos. Apesar de tanto o complexo ternário como a Moxifloxacina interagirem com os dois sistemas lipídicos é importante referir que o metaloantibiótico não interage tanto com o sistema lipídico DMPC, ou seja, as membranas celulares dos mamíferos não serão tão afetadas na presença do metaloantibiótico, sendo este um bom princípio para o complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina ser utilizado como um novo fármaco.

Já no caso dos complexos Cu(II)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina e Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina verifica-se que o primeiro complexo apresenta uma partição no sistema lipídico *E. coli* T maior do que o segundo complexo, enquanto que, com o sistema lipídico DMPC, a situação é inversa. A partir destes dados conclui-se que ambos os complexos são fármacos promissores.

Tabela 13 – Coeficientes de partição da Moxifloxacina livre e do complexo Cu(II)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina, nos sistemas lipídicos DMPC e extrato total de *E. coli*. [60]

Sistema lipídico	K_p (Mxfx) (M^{-1})	K_p (Cu(II)/Mxfx/Phen) (M^{-1})
<i>E. coli</i> T	256 ± 13	1007 ± 4
DMPC	232 ± 62	~0

5. Estudos de localização membranar

As técnicas de fluorescência em modo estacionário e resolvida no tempo têm sido usadas para obter informação acerca da localização de fármacos em lipossomas.

A localização do complexo ternário nos modelos membranares pode ser determinada através da sua extinção de fluorescência na presença do ião iodeto, um *quencher* que afeta as propriedades de fluorescência de uma espécie apenas quando esta não se encontra inserida nas camadas mais profundas da membrana. Além disso, a localização do complexo ternário nos modelos membranares também pode ser avaliada através da incorporação de sondas de fluorescência nos sistemas lipídicos e, neste caso, o metaloantibiótico funciona como agente de extinção de fluorescência.

5.1. Utilização do iodeto de potássio como agente de extinção de fluorescência

5.1.1. Determinação das constantes de Stern-Volmer por fluorescência em modo estacionário

Para avaliar a localização do complexo ternário nos dois modelos membranares foi necessário traçar o espectro de emissão de fluorescência do metaloantibiótico, na ausência (Figura 29) e na presença dos sistemas lipídicos (Figura 30 e 31), com a adição de concentrações crescentes do agente de extinção KI.

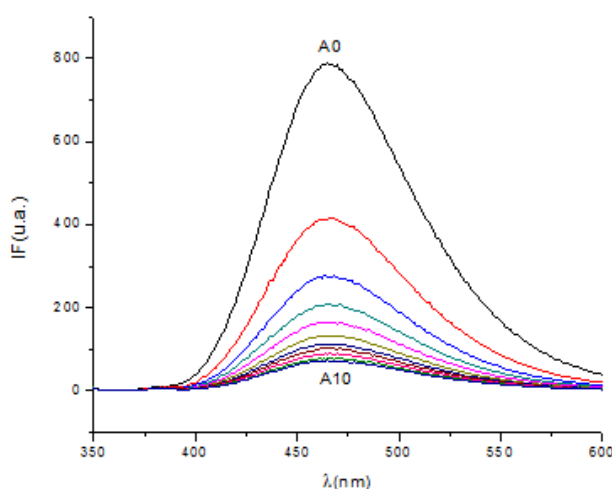


Figura 29 – Espectro de emissão de fluorescência do complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina, na ausência de lípido (A0) e na presença (A1 a A10) de concentrações crescentes (μM) de KI: (A1) 50; (A2) 100; (A3) 150; (A4) 200; (A5) 250; (A6) 300; (A7) 350; (A8) 400; (A9) 450; (A10) 500.

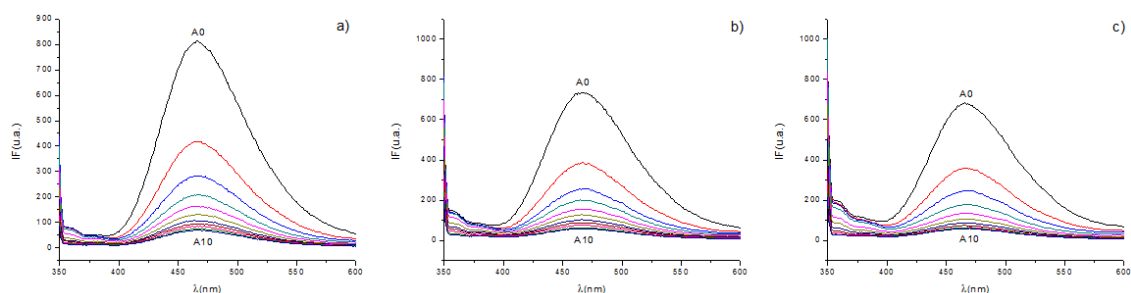


Figura 30 – Espectros de emissão de fluorescência do complexo Fe(III)/Moxifloxacin/1,10-Fenantrolina, na presença de *E.coli* T - a) 250μM; b) 500μM e c) 750μM - e na presença (A1 a A10) de concentrações crescentes (μM) de KI: (A1) 50; (A2) 100; (A3) 150; (A4) 200; (A5) 250; (A6) 300; (A7) 350; (A8) 400; (A9) 450; (A10) 500.

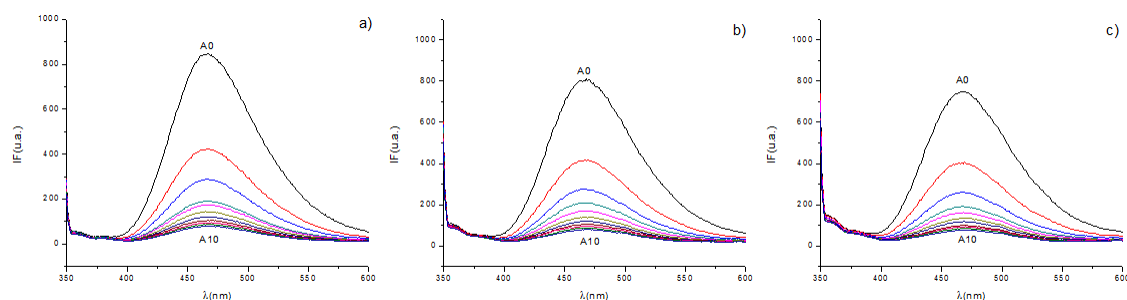


Figura 31 – Espectros de emissão de fluorescência do complexo Fe(III)/Moxifloxacin/1,10-Fenantrolina, na presença de DMPC - a) 250μM; b) 500μM e c) 750μM - e na presença (A1 a A10) de concentrações crescentes (μM) de KI: (A1) 50; (A2) 100; (A3) 150; (A4) 200; (A5) 250; (A6) 300; (A7) 350; (A8) 400; (A9) 450; (A10) 500.

O valor das constantes de Stern-Volmer foi obtido através do ajuste linear da equação (11) aos dados experimentais obtidos. Para isso efetuou-se a representação gráfica $I_F^0/I_F = f([KI])$, apresentada na figura 32.

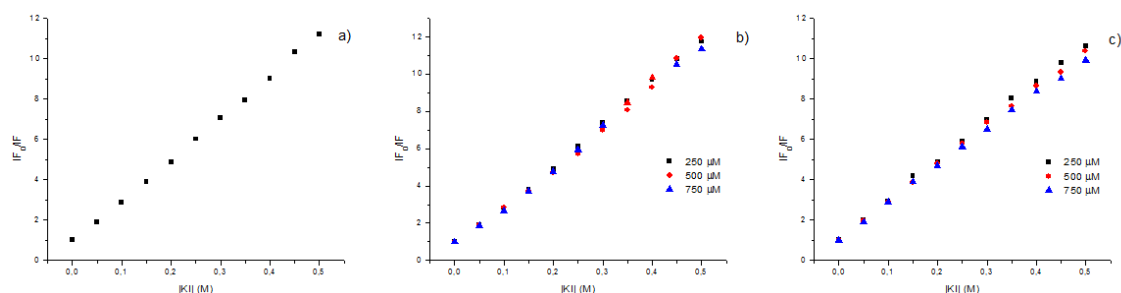


Figura 32 – Representação gráfica $I_F^0/I_F = f([KI])$ para obtenção das constantes de Stern-Volmer (a) do complexo ternário; (b) do complexo ternário, na presença de concentrações crescentes de extrato total de *E.coli* e (c) do complexo ternário, na presença de concentrações crescentes de DMPC, através da fluorescência em modo estacionário.

Os valores obtidos para as constantes de Stern-Volmer do complexo ternário na ausência e na presença dos dois sistemas lipídicos são apresentados na tabela 14.

Tabela 14 – Valor das constantes de Stern-Volmer, obtidos por fluorescência em modo estacionário.

	Fe(III)/Mxfr/Phen	<i>E.coli</i> T (μM)			DMPC (μM)		
		250	500	750	250	500	750
K_{SV} (M⁻¹)	20,2 ± 0,1	21,3 ± 0,2	19,7 ± 0,3	20,5 ± 0,3	19,6 ± 0,1	18,88 ± 0,09	18,2 ± 0,1

5.1.2.Determinação das constantes de Stern-Volmer por fluorescência resolvida no tempo

Na determinação das constantes de Stern-Volmer, por fluorescência resolvida no tempo, foram medidos os tempos de semivida do metaloantibiótico, na ausência e na presença dos sistemas lipídicos, com a adição de concentrações crescentes do agente de extinção KI.

Após a obtenção dos tempos de semivida, o valor das constantes de Stern-Volmer foi obtido através do ajuste linear da equação (13) aos dados experimentais obtidos. Para isso efetuou-se a representação gráfica $\tau_0/\tau = f([KI])$, apresentada na figura 33.

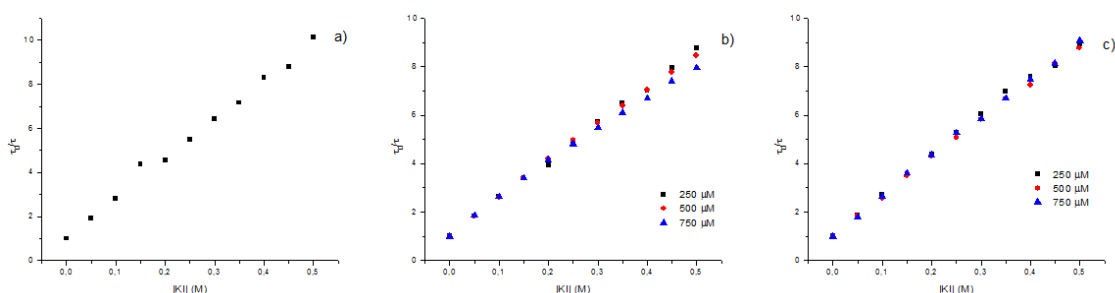


Figura 33 - Representação gráfica $\tau_0/\tau = f([KI])$ para obtenção das constantes de Stern-Volmer (a) do complexo ternário; (b) do complexo ternário, na presença de concentrações crescentes de extrato total de *E.coli* e (c) do complexo ternário, na presença de concentrações crescentes de DMPC, através da fluorescência resolvida no tempo.

Os valores obtidos para as constantes de Stern-Volmer do complexo ternário na ausência e na presença dos dois sistemas lipídicos são apresentados na tabela 15.

Tabela 15 - Valor das constantes de Stern-Volmer, obtidos por fluorescência resolvida no tempo.

	Fe(III)/Mxfr/Phen	<i>E.coli</i> T (μM)			DMPC (μM)		
		250	500	750	250	500	750
K_{SV} (M⁻¹)	18,0 ± 0,3	15,9 ± 0,1	15,2 ± 0,1	14,5 ± 0,2	16,3 ± 0,2	15,9 ± 0,1	16,2 ± 0,1

5.1.3. Discussão de resultados

Através dos resultados obtidos pela técnica de fluorescência resolvida no tempo verificou-se que, à medida que a concentração de sistema lipídico aumenta, a constante de Stern-Volmer diminui, em relação ao valor de K_{SV} obtido para o complexo ternário na ausência de lípido.

Esta diminuição do K_{SV} indica que, quando é adicionado o agente de extinção de fluorescência, a sua interação com o complexo ternário é menor. Isto implica que o complexo ternário se encontra nas camadas mais internas da bicamada fosfolipídica, ou seja, a sua fluorescência não é afetada pela ação do KI e, conseqüentemente, a constante de Stern-Volmer diminui.

Além disso observa-se que a diminuição do valor da constante é mais acentuada na presença do sistema lipídico de *E.coli* T do que na presença do modelo membranar DMPC. Esta observação indica-nos que o metaloantibiótico encontra-se nas camadas mais internas do modelo de *E.coli* T enquanto que, na presença de DMPC, ainda existe metaloantibiótico no exterior do modelo membranar, que está sujeita à ação do agente de extinção de fluorescência.

A localização do complexo ternário nas camadas mais internas do sistema lipídico de *E.coli* T mostra que este metaloantibiótico interage mais com as membranas dos sistemas miméticos de bactérias Gram-negativas, não afetando tanto as membranas biológicas dos mamíferos.

Por outro lado, nos resultados obtidos por fluorescência em modo estacionário, não se consegue obter a mesma conclusão que a da técnica anterior, no caso do sistema extrato total de *E.coli*. Esta situação pode dever-se ao facto da técnica de fluorescência em modo estacionário depender das concentrações utilizadas.

5.2. Utilização de sondas de fluorescência incorporadas nos sistemas lipídicos

5.2.1 Determinação das constantes de Stern-Volmer por fluorescência resolvida no tempo

Na determinação das constantes de Stern-Volmer, por fluorescência resolvida no tempo, foram medidos os tempos de semivida das sondas DPH e TMA-DPH incorporadas nos dois sistemas lipídicos com a adição de concentrações crescentes do metaloantibiótico e da fluoroquinolona livre.

Após a obtenção dos tempos de semivida, o valor das constantes de Stern-Volmer foi obtido através do ajuste linear da equação (13) aos dados experimentais obtidos. Para isso efetuou-se a representação gráfica $\tau_0/\tau = f([Fármaco]_{membranar})$, apresentada nas figuras 34 e 35.

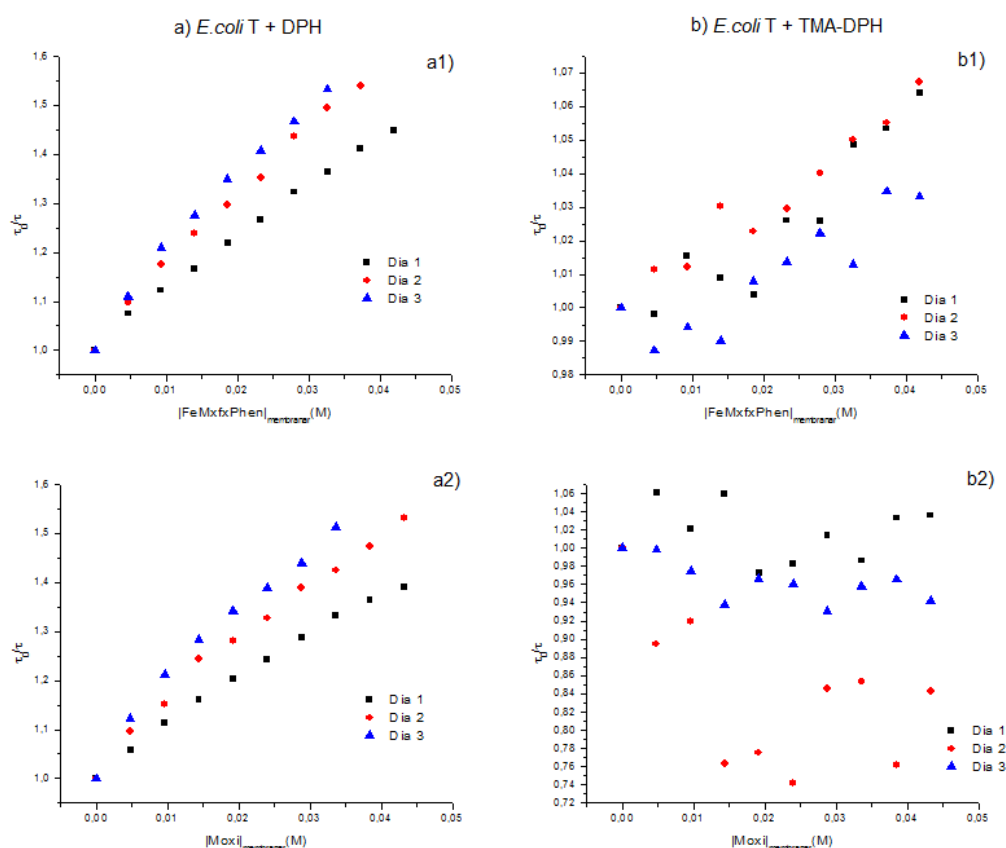


Figura 34 - Representação gráfica $\tau_0/\tau = f([Fármaco]_{membranar})$ para obtenção das constantes de Stern-Volmer (a) da sonda DPH incorporada no sistema extrato total de *E.coli* com adição de concentrações crescentes de metaloantibiótico (a1) e de fluoroquinolona livre (a2) e (b) da sonda TMA-DPH incorporada no sistema extrato total de *E.coli* com adição de concentrações crescentes de metaloantibiótico (b1) e de fluoroquinolona livre (b2).

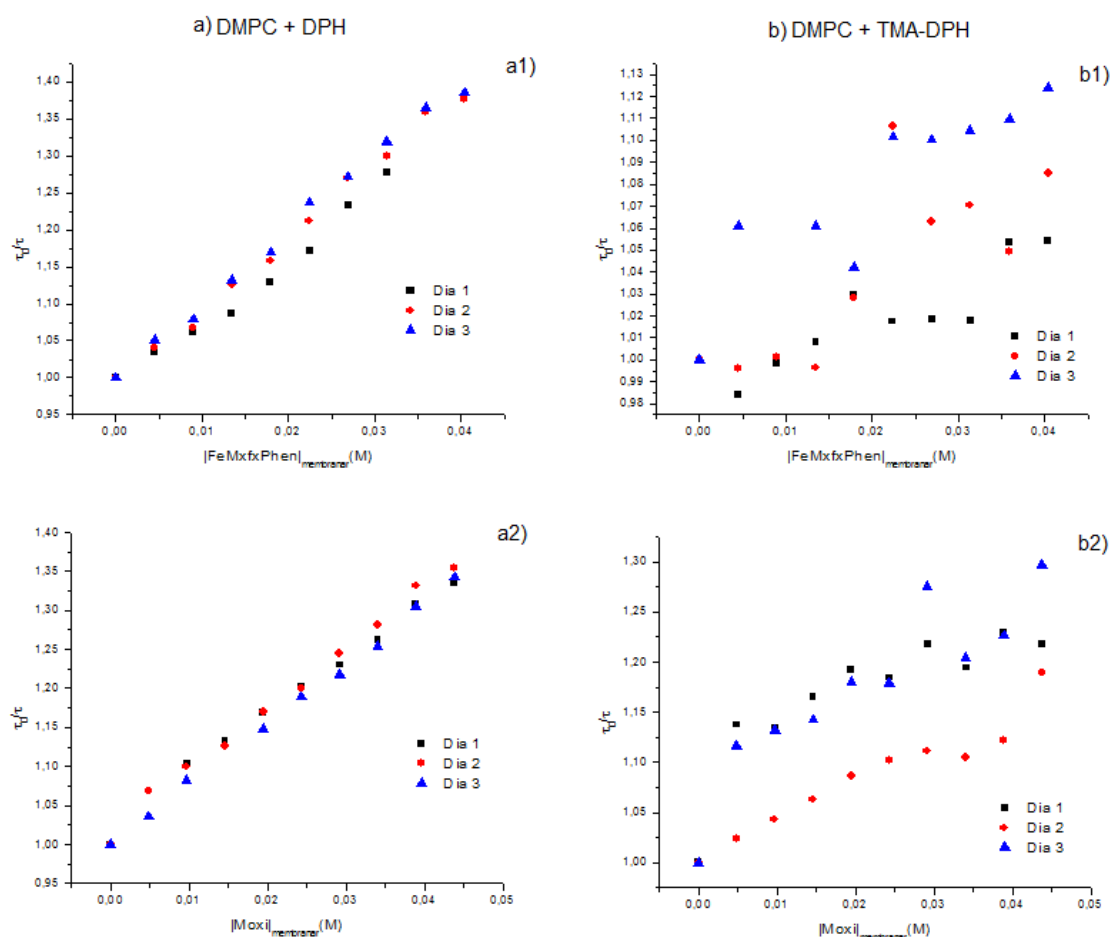


Figura 35 - Representação gráfica $\tau_0/\tau = f([Fármaco]_{membranar})$ para obtenção das constantes de Stern-Volmer (a) da sonda DPH incorporada no sistema DMPC com adição de concentrações crescentes de metaloantibiótico (a1) e de fluoroquinolona livre (a2) e (b) da sonda TMA-DPH incorporada no sistema DMPC com adição de concentrações crescentes de metaloantibiótico (b1) e de fluoroquinolona livre (b2).

Os valores obtidos para as constantes de Stern-Volmer do complexo ternário e da fluoroquinolona na forma livre nos dois sistemas lipídicos com sondas incorporadas são apresentados nas tabelas 16 e 17, respetivamente.

Tabela 16 - Valor das constantes de Stern-Volmer para o complexo Fe(III)/Moxifloxacin/1,10-Fenantrolina, obtidos por fluorescência resolvida no tempo, utilizando sondas de fluorescência.

Fe(III)/Mxfx/Phen		<i>E.coli</i> T + DPH	<i>E.coli</i> T + TMA-DPH	DMPC + DPH	DMPC + TMA-DPH
K_{SV} (M⁻¹)	Dia 1	11,2 ± 0,2	-	8,1 ± 0,2	-
	Dia 2	15,3 ± 0,3		9,6 ± 0,1	
	Dia 3	17,3 ± 0,5		10,0 ± 0,1	

Tabela 17 - Valor das constantes de Stern-Volmer para a Moxifloxacina, obtidos por fluorescência resolvida no tempo, utilizando sondas de fluorescência.

Mxfix		<i>E.coli</i> T + DPH	<i>E.coli</i> T + TMA-DPH	DMPC + DPH	DMPC + TMA-DPH
K_{SV} (M⁻¹)	Dia 1	9,7 ± 0,2	-	7,9 ± 0,2	-
	Dia 2	13,0 ± 0,4		8,4 ± 0,2	
	Dia 3	16,2 ± 0,7		9,0 ± 0,3	

5.2.2. Discussão de resultados

A incorporação de sondas de fluorescência nos modelos membranares foi outro método utilizado para avaliar a localização do complexo ternário nos sistemas lipídicos.

Através da técnica de fluorescência resolvida no tempo verificou-se que, no sistema extrato total de *E.coli*, a interação do metaloantibiótico e da fluoroquinolona livre é maior com a sonda DPH do que com a sonda TMA-DPH. Este facto indica que tanto o complexo ternário como a fluoroquinolona se encontram nas camadas mais internas deste sistema lipídico e, consequentemente, a sua interação com a sonda DPH (sonda mais interna) é maior, aumentando o valor da constante de Stern-Volmer.

Por outro lado, não foi possível determinar o valor da constante de Stern-Volmer relativo à sonda TMA-DPH incorporada neste sistema lipídico. Isto indica que não ocorre interação entre os dois fármacos e a sonda mais externa, comprovando o facto destes antibióticos se encontrarem inseridos nas camadas mais internas do extrato total de *E.coli*.

Além disso observou-se que os valores das constantes de Stern-Volmer relativos à sonda DPH inserida no sistema extrato total de *E.coli* são maiores na presença do complexo ternário do que com a Moxifloxacina livre, indicando que o metaloantibiótico se encontra mais inserido nas camadas internas deste sistema lipídico do que a fluoroquinolona. Assim pode-se afirmar que o complexo metal/fluoroquinolona poderá ser um antibiótico mais eficaz que a respetiva fluoroquinolona livre, na medida em que interage mais com o modelo membranares bacteriano, tornando-se uma boa hipótese no combate à resistência bacteriana.

No caso da incorporação das sondas de fluorescência no sistema lipídico DMPC verifica-se que tanto o metaloantibiótico como a fluoroquinolona livre interagem mais com a sonda mais interna (sonda DPH) do que com a sonda mais externa (sonda TMA-DPH). Estes dados indicam que os dois fármacos se localizam nas camadas mais internas do modelo membranares DMPC e, consequentemente, a sua interação com as membranas biológicas dos mamíferos também ocorre tal como no modelo membranares bacteriano.

No entanto, a variação dos valores das constantes de Stern-Volmer é maior no caso do modelo extrato total de *E.coli* do que no sistema membranares DMPC, tanto para o complexo ternário como para a Moxifloxacina livre. Assim, estes dois fármacos poderão ser utilizados como potenciais antibióticos no combate à resistência bacteriana, sendo que o complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina tem a vantagem de penetrar

mais nas camadas dos modelos membranares bacterianos e, conseqüentemente, pode desempenhar a sua função de agente antimicrobiano.

CAPÍTULO IV: Considerações Finais

O uso indevido e indiscriminado de antibióticos é um dos principais problemas da sociedade atual no combate de infecções bacterianas. Por esta razão têm sido desenvolvidas diversas estratégias no combate à resistência bacteriana.

Uma das principais e mais eficazes estratégias é a síntese de fármacos novos ou modificados. Dos antibióticos utilizados no tratamento de infecções bacterianas destacam-se as fluoroquinolonas que têm apresentado bons resultados no combate de infecções biológicas.

Além disso, a complexação com iões metálicos tem aumentado a atividade antimicrobiana das fluoroquinolonas, sendo esta uma das mais recentes estratégias para contornar a resistência bacteriana.

Tal como já foi referido, a complexação de fluoroquinolonas com o ião metálico Cu^{2+} tem apresentado resultados positivos pois estes complexos apresentam estabilidade em meio fisiológico e possuem atividade antibacteriana.

Uma das principais questões que se coloca é se outros metais poderão complexar com as fluoroquinolonas e, consequentemente, formar complexos estáveis e que possam ser antibióticos promissores. Neste estudo utilizou-se o ião Fe^{3+} e avaliou-se a sua complexação e estabilidade com a fluoroquinolona Moxifloxacina, bem como a sua interação e localização com modelos membranares de forma a caracterizar a sua potencialidade como metaloantibiótico.

Inicialmente foi necessário caracterizar o comportamento deste complexo em pH fisiológico, tendo-se verificado que o complexo sob a forma de sistema ternário $\text{Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina}$ é mais estável que o complexo binário $\text{Fe(III)/Moxifloxacina}$, apresentando o primeiro complexo maiores constantes de estabilidade.

Além disso, as constantes de estabilidade obtidas para o complexo ternário são superiores às do complexo $\text{Cu(II)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina}$, podendo-se concluir que o complexo de Fe(III) poderá ser um potencial metaloantibiótico.

De seguida avaliou-se a interação do complexo ternário com dois modelos membranares, tendo-se verificado uma maior interação com o modelo mimético de uma membrana de uma bactéria Gram-negativa do que com o modelo mimético de uma membrana dos mamíferos, mostrando que este complexo é um potencial fármaco que interage mais facilmente com as membranas de bactérias Gram-negativas, causadoras de diversas infeções, afetando menos as membranas celulares dos mamíferos.

Por último caracterizou-se o complexo ternário quanto à sua localização nos modelos membranares, recorrendo-se a dois métodos: utilização de um agente de extinção de fluorescência e incorporação de sondas de fluorescência nos sistemas lipídicos.

Em ambos os métodos verificou-se que o complexo ternário se encontrava nas camadas mais internas do modelo mimético de bactérias Gram-negativas enquanto que só uma fração do metaloantibiótico penetrava nas camadas do modelo sintético DMPC. Estes resultados permitiram concluir que o complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina pode penetrar nas camadas das bactérias Gram-negativas e, conseqüentemente, desenvolver a sua atividade antimicrobiana no tratamento de infeções, sem afetar tanto as membranas dos mamíferos.

Assim pode-se concluir que, além do ião Cu^{2+} , o ião Fe^{3+} pode ser utilizado na complexação com fluoroquinolonas, de maneira a aumentar a sua atividade antibacteriana e, assim, desenvolver novos fármacos que permitam diminuir a resistência dos microrganismos a estes antibióticos.

No entanto é importante referir que outros estudos, como testes microbiológicos e toxicológicos, deverão ser necessários para comprovar a atividade antibacteriana de complexo Fe(III)/Moxifloxacina/1,10-Fenantrolina e, assim, afirmar que este complexo pode ser uma nova estratégia, sem efeitos adversos, no tratamento de infeções bacterianas.

CAPÍTULO V: Bibliografia

- [1] Bonomo R.A. (1998). The New Fluoroquinolone Antibiotics. *Clinical Microbiology Newsletter*, 20: 197-201.
- [2] Blondeau, J.M. (2004). Fluoroquinolones: Mechanism of Action, Classification, and Development of Resistance. *Survey of Ophthalmology*, 49: 73-78.
- [3] Neves, P., Berkane, E., Gameiro, P., Winterhalter, M., de Castro, B. (2005). Interaction between quinolones antibiotics and bacterial outer membrane porin OmpF. *Biophysical Chemistry*, 113: 123-128.
- [4] King, D.E., Malone, R., Lilley, S.H. (2000). New Classification and Update on the Quinolone Antibiotics. *American Family Physician*, 61 (9): 2741-2748.
- [5] Gootz, T.D., Brighty, K.E. (1996). Fluoroquinolone Antibacterials: SAR, Mechanism of Action, Resistance, and Clinical Aspects. *Medicinal Research Reviews*, 16 (5): 433-486.
- [6] Soni, K. (2012). Fluoroquinolones: Chemistry and Action – A Review. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2 (1): 43-53.
- [7] Peterson, L. R. (2001). Quinolone Molecular Structure-Activity Relationships: What We Have Learned about Improving Antimicrobial Activity. *Clinical Infectious Diseases*, 33: 180-186.
- [8] Scholar, E. M. (2003). Fluoroquinolones: Past, Present and Future of a Novel Group of Antibacterial Agents. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 66: 164-172.
- [9] Blondeau, J. M. (1999). Expanded Activity and Utility of the New Fluoroquinolones: A Review. *Clinical Therapeutics*, 21 (1): 3-40.
- [10] Belal, F., Al-Majed, A. A., Al-Obaid, A. M. (1999). Methods of analysis of 4-quinolone antibacterials. *Talanta*, 50: 765-786.
- [11] Cross, J. T. (2001). Fluoroquinolones. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 12 (3): 211-223.

- [12] Langlois, M. H., Montagut, M., Dubost, J. P. (2005). Protonation equilibrium and lipophilicity of Moxifloxacin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37: 389-393.
- [13] Anderson, V. E., Gootz, T. D., Osheroff, N. (1998). Topoisomerase IV Catalysis and the Mechanism of Quinolone Action. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (28): 17879-17885.
- [14] Fernandes, P., Sousa, I., Cunha-Silva, L., Ferreira, M., de Castro, B., Pereira, E. F., Feio, M. J., Gameiro, P. (2014). Synthesis, characterization and antibacterial studies of a copper (II) lomefloxacin ternary complex. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 131: 21-29.
- [15] Sousa, I., Claro, V., Pereira, J. L., Amaral, A. L., Cunha-Silva, L., de Castro, B., Feio, M. J., Pereira, E., Gameiro, P. (2012). Synthesis, characterization and antibacterial studies of a copper (II) levofloxacin ternary complex. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 110: 64-71.
- [16] Drevensek, P., Kosmrlj, J., Giester, G., Skauge, T., Sletten, E., Specic, K., Turel, I. (2006). X-Ray crystallographic, NMR and antimicrobial activity studies of magnesium complexes of fluoroquinolones – racemic ofloxacin and its S-form, levofloxacin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100: 1755-1763.
- [17] Turel, I., Leban, I., Klintschar, G., Bukovec, N., Zalar, S. (1997). Synthesis, Crystal Structure, and Characterization of Two Metal-Quinolone Compounds. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 66: 77-82.
- [18] Uivarosi, V. (2013). Metal Complexes of Quinolone Antibiotics and Their Applications: An Update. *Molecules*, 18: 11153-11197.
- [19] Schumann, W. (2006). *Dynamics of the Bacterial Chromosome. Structure and Function*. Wiley-VCH.
- [20] Murzyn, K., Róg, T., Pasenkiewicz-Gierula, M. (2005). Phosphatidylethanolamine-Phosphatidylglycerol Bilayer as a Model of the Inner Bacterial Membrane. *Biophysical Journal*, 88: 1091-1103.

- [21] Ribeiro, C., Lopes, S. C., Gameiro, P. (2011). New Insights into the Translocation Route of Enrofloxacin and Its Metalloantibiotics. *Journal Membrane Biology*, 241: 117-125.
- [22] Lopes, S. C., Neves, C. S., Eaton, P., Gameiro, P. (2012). Improved model systems for bacterial membranes from differing species: The importance of varying composition in PE/PG/cardiophilin ternary mixtures. *Molecular Membrane Biology*, 1-11.
- [23] Lopes, S., Neves, C. S., Eaton, P., Gameiro, P. (2010). Cardiophilin, a key component to mimic the *E. coli* bacterial membrane in model systems revealed by dynamic light scattering and steady-state fluorescence anisotropy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398: 1357-1366.
- [24] Berlanga, M., Ruiz, N., Hernandez-Borrell, J., Montero, T., Viñas, M. (2000). Role of the outer membrane in the accumulation of quinolones by *Serratia marcescens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 46: 716-722.
- [25] Sezer, A. D. (2014). *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. InTech.
- [26] Lasic, D. D. (1998). Novel applications of liposomes. *Elsevier Science*, 307-321, Vol. 16.
- [27] Shaheen, S. M., Ahmed, F. R. S. (2006). Liposome as a Carrier for Advanced Drug Delivery. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9 (6): 1181-1191.
- [28] Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8: 102.
- [29] Batista, C. M., de Carvalho, C. M. B., Magalhães, N. S. S. (2007). Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43 (2): 167-179.
- [30] Varanda, F., de Melo, M. J. P., Caço, A. L., Dohrn, R., Makrydaki, F. A., Voutsas, E., Tassios, D., Marrucho, I. M. (2006). Solubility of Antibiotics in Different Solvents. 1. Hydrochloride Forms of Tetracycline, Moxifloxacin and Ciprofloxacin. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 45 (18): 6368-6374.

- [31] Park, H. R., Kim, T. H., Bark, K. M. (2002). Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 37: 443-460.
- [32] Lakowicz, J.R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York, Springer, 3ªed..
- [33] Valeur B. (2001). *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH.
- [34] Nakaema, M. K. K., Sanches, R. (1999). Fluorometria no Domínio da Frequência. *Química Nova*, 22 (3): 412-416.
- [35] Feio, M. J., Sousa, I., Ferreira, M., Cunha-Silva, L., Saraiva, R. G., Queirós, C., Alexandre, J. G., Claro, V., Mendes, A., Ortiz, R., Lopes, S., Amaral, A. L., Lino, J., Perelló, L., Gameiro, P. (2014). Fluoroquinolone-metal complexes: A route to counteract bacterial resistance?. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 138: 129-143.
- [36] Santos, N. C., Prieto, M., Castanho, M. A. R. B. (2003). Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1612: 123-135.
- [37] Sultana, N., Arayne, M. S., Rizvi, S. B. S., Haroon, U., Mesaik, M. A. (2013). Synthesis, spectroscopic, and biological evaluation of some levofloxacin metal complexes. *Medicinal Chemistry Research*, 22: 1371-1377.
- [38] Djurdjevic, P., Jakovljevic, I., Joksovic, L., Ivanovic, N., Jelikic-Stankov, M. (2014). The Effect of Some Fluoroquinolone Family Members on Biospeciation of Copper(II), Nickel(II) and Zinc(II) Ions in Human Plasma. *Molecules*, 19: 12194-12223.
- [39] Lecomte, S., Baron, M. H., Chenon, M. T., Couprie, C., Moreau, N. J. (1994). Effect of Magnesium Complexation by Fluoroquinolones on Their Antibacterial Properties. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38 (12): 2810-2816.
- [40] Turel, I., Sonc, A., Zupancic, M., Sepcic, K., Turk, T. (2000). Biological Activity of Some Magnesium(II) Complexes of Quinolones. *Metal-Based Drugs*, 7 (2): 101-104.

- [41] Obaleye, J. A., Akinremi, C. A., Balogun, E. A., Adebayo, J. O. (2007). Toxicological studies and antimicrobial properties of some Iron(III) complexes of Ciprofloxacin. *African Journal of Biotechnology*, 6 (24): 2826-2832.
- [42] Wallis, S. C., Gahan, L. R., Charles, B. G., Hambley, T. W. (1995). Synthesis and X-Ray Structural Characterization of an Iron(III) Complex of the Fluoroquinolone Antimicrobial Ciprofloxacin, $[\text{Fe}(\text{CIP})(\text{NTA})]_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. *Polyhedron*, 14: 2835-2840.
- [43] Efthimiadou, E. K., Karaliota, A., Psomas, G. (2010). Metal complexes of the third-generation quinolone antimicrobial drug sparfloxacin: Structure and biological evaluation. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104: 455-466.
- [44] Messenger, A. J. M., Barclay, R. (1983). Bacteria, Iron and Pathogenicity. *Biochemical Education*, 11 (2): 54-63.
- [45] Huang, K. C., Mukhopadhyay, R., Wen, B., Gitai, Z., Wingreen, N. S. (2008). Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (49): 19282-19287.
- [46] Raven, P. H., Johnson, G. B. (2002). *Biology*, 6^aEd., McGraw-Hill. Boston.
- [47] Dua, J. S., Rana, A. C., Bhandari, A. K. (2012). Liposome: Methods of Preparation and Applications. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, 3: 14-20.
- [48] Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Limayem-Blouza, I., Sfar, S., Charcosset, C., Fessi, H. (2012). Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 1: 147-168.
- [49] Sharma, A., Sharma, U. S. (1997). Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*, 154: 123-140.

- [50] Qasem, A., Mohsin, M., Al-Saeedi, A., Hussain, S. (2015). Study of Stability Constant of Metal-Drug Complexes Using Potentiometric Titration Technique. *Journal of Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 172-181.
- [51] Kawai, Y., Matsubayashi, K., Hakusui, H. (1996). Interaction of Quinolones with Metal Cations in Aqueous Solution. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 44 (8): 1425-1430.
- [52] Lee, D. S., Han, H. J., Kim, K., Park, W. B., Cho, J. K., Kim, J. H. (1994). Dissociation and complexation of fluoroquinolone analogues. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 12 (2): 157-164.
- [53] Sharma, R. K., Chopra, S., Kidwai, M. (2001). Formation constants and molecular modeling studies on interaction of metal ions with 6-fluoro-7-(5-nonyl-1,3,4-oxadiazol-2-ylsulphonyl)-4-quinolone-3-carboxylic acid [QDA]. *Indian Journal of Chemistry*, 40: 1240-1242.
- [54] Gameiro, P., Rodrigues, C., Baptista, T., Sousa, I., de Castro, B. (2007). Solution studies on binary and ternary complexes of copper(II) with some fluoroquinolones and 1,10-phenanthroline: Antimicrobial activity of ternary metalloantibiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, 334: 129-136.
- [55] Sousa, I., Claro, V., Pereira, J. L., Amaral, A. L., Cunha-Silva, L., de Castro, B., Feio, M. J., Pereira, E., Gameiro, P. (2012). Synthesis, characterization and antibacterial studies of a copper(II) levofloxacin ternary complex. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 110: 64-71.
- [56] Neves, A. R., Nunes, C., Amenitsch, H., Reis, S. (2016). Effects of resveratrol on the structure and fluidity of lipid bilayers: a membrane biophysical study. *Soft Matter*, 12: 2118-2126.
- [57] Kubista, M., Sjöback, R., Eriksson, S., Albinsson, B. (1994). Experimental Correction for the Inner-filter Effect in Fluorescence Spectra. *Analyst*, 119: 417-419.
- [58] Rodrigues, C. Gameiro, P., Prieto, M., de Castro, B. (2003). Interaction of rifampicin and isoniazid with large unilamellar liposomes: spectroscopic location studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1620: 151-159.

[59] Neves, P., Sousa, I., Winterhalter, M., Gameiro, P. (2009). Fluorescence Quenching as a Tool to Investigate Quinolone Antibiotic Interactions with Bacterial Protein OmpF. *Journal of Membrane Biology*, 227: 133-140.

[60] Lopes, S. C., Ribeiro, C., Gameiro, P. (2013). A New Approach to Counteract Bacteria Resistance: A Comparative Study Between Moxifloxacin and a New Moxifloxacin Derivative in Different Model Systems of Bacterial Membrana. *Chemical Biology and Drug Design*, 81: 265-274.